



Einsatzgebiete der LC/MS(MS)

Was bietet die
Massenspektrometrie für den
HPLC Anwender?

Ettlingen, 25. Mai 2011

Köln, 26. Mai 2011

Susanne Sölter

Produktspezialistin HPLC/MS



Agilent Technologies

HPLC-Detektoren

Detektor	detektiert	Max. Nachweisgrenzen (injizierte Menge)	Destruktiv?
UV und DAD	Substanzen mit Chromophoren	0.1 bis 10 ng	Nein
IR	universell	1 ng	Nein
Fluoreszenz	Substanzen, die zur Fluoreszenz angeregt werden können	0.01 ng	Nein
ELS	universell	1 bis 10 ng	ja
MS	Ionisierbare Substanzen	Femto-bis Attogramm	ja

Typen von Massenanalysatoren

Gerätetyp		Hochauflösend?	MS/MS-fähig
Single-Quadrupol	Transmissions-MS	Nein	Nein
Triple-Quadrupol	Transmissions-MS	Nein	Ja
TOF	Transmissions-MS	Ja	Nein
Q-TOF	Transmissions-MS	Ja	Ja
Ionenfallen	Speicher-MS	Nein	Ja
Sektorfeld	Transmissions-MS	Ja	Nein
FT-ICR	Speicher-MS	Nein	Ja



Agilent LC/MS Portfolio

- 6100 Singlequadrupole
- 6200 TOF
- 6400 Triplequadrupole
- 6500 QTOF



Einsatzgebiete der LC/MS(MS)

Wenn hohe Anforderungen an

die Nachweisgrenze

die Geschwindigkeit

die Selektivität

den Informationsgehalt

gestellt werden, ist ein MS der Detektor der Wahl.
Warum???

Einsatzgebiete der LC/MS(MS)

Wenn hohe Anforderungen an

die Nachweisgrenze

die Geschwindigkeit

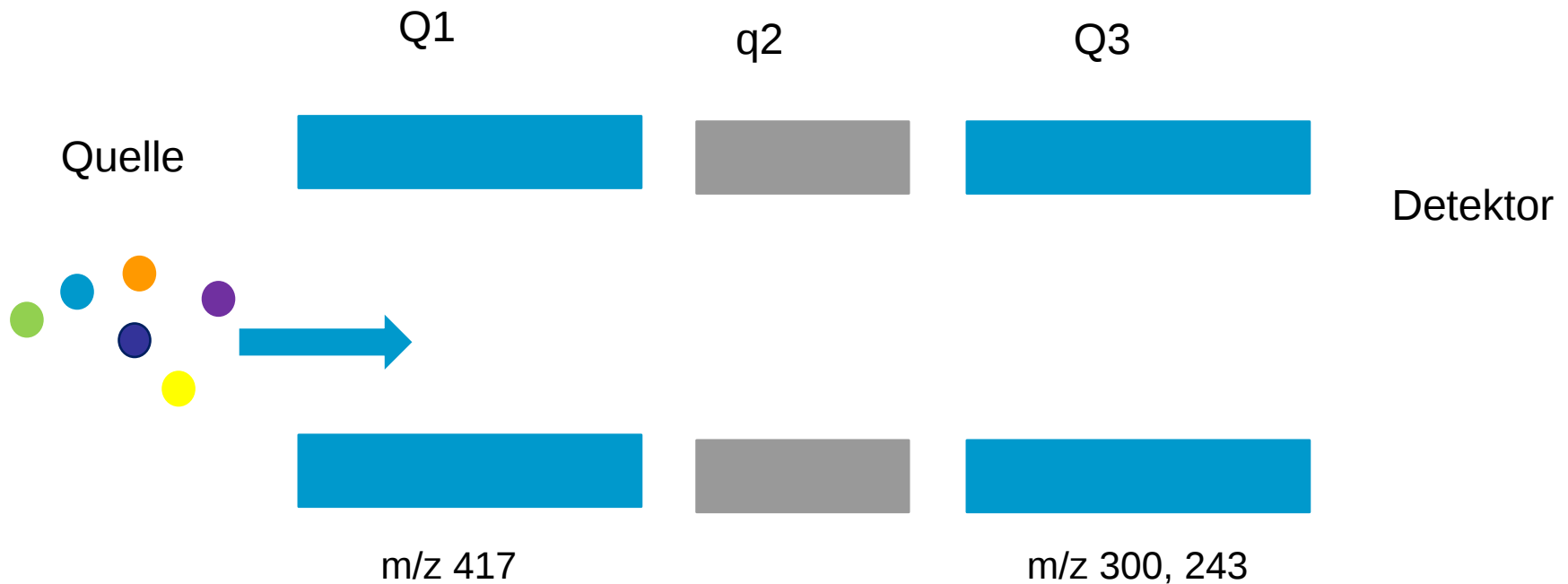
die Selektivität

den Informationsgehalt

gestellt werden, ist ein MS der Detektor der Wahl.
Warum???

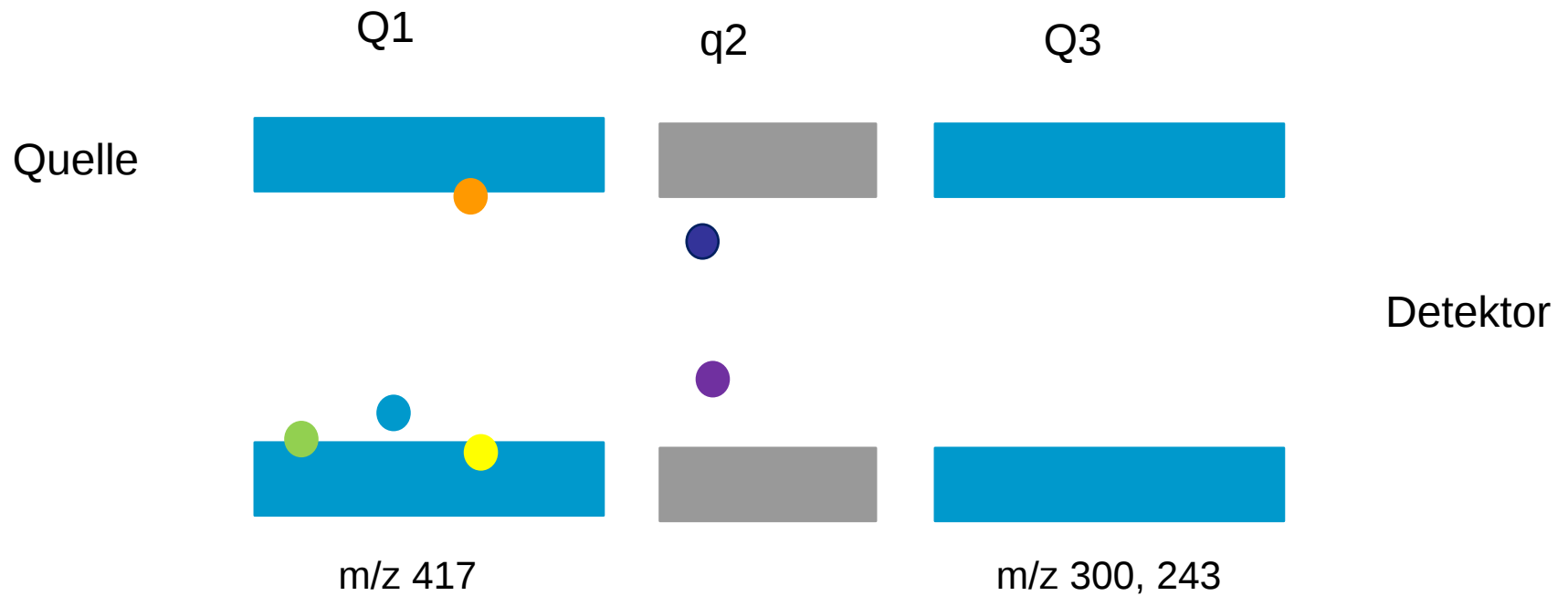
Niedrige Nachweisgrenzen und hohe Selektivität

Massenspektrometer der Wahl: Triple-Quadrupol



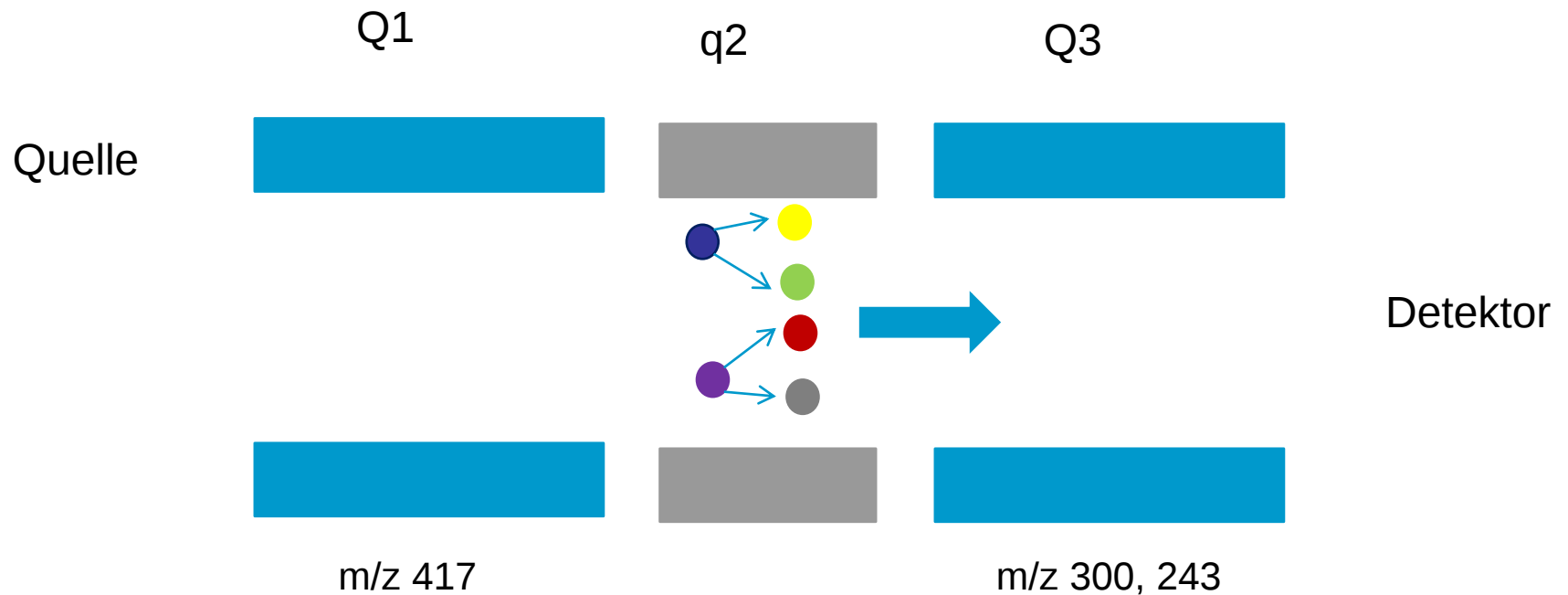
Niedrige Nachweisgrenzen und hohe Selektivität

Triple-Quadrupol



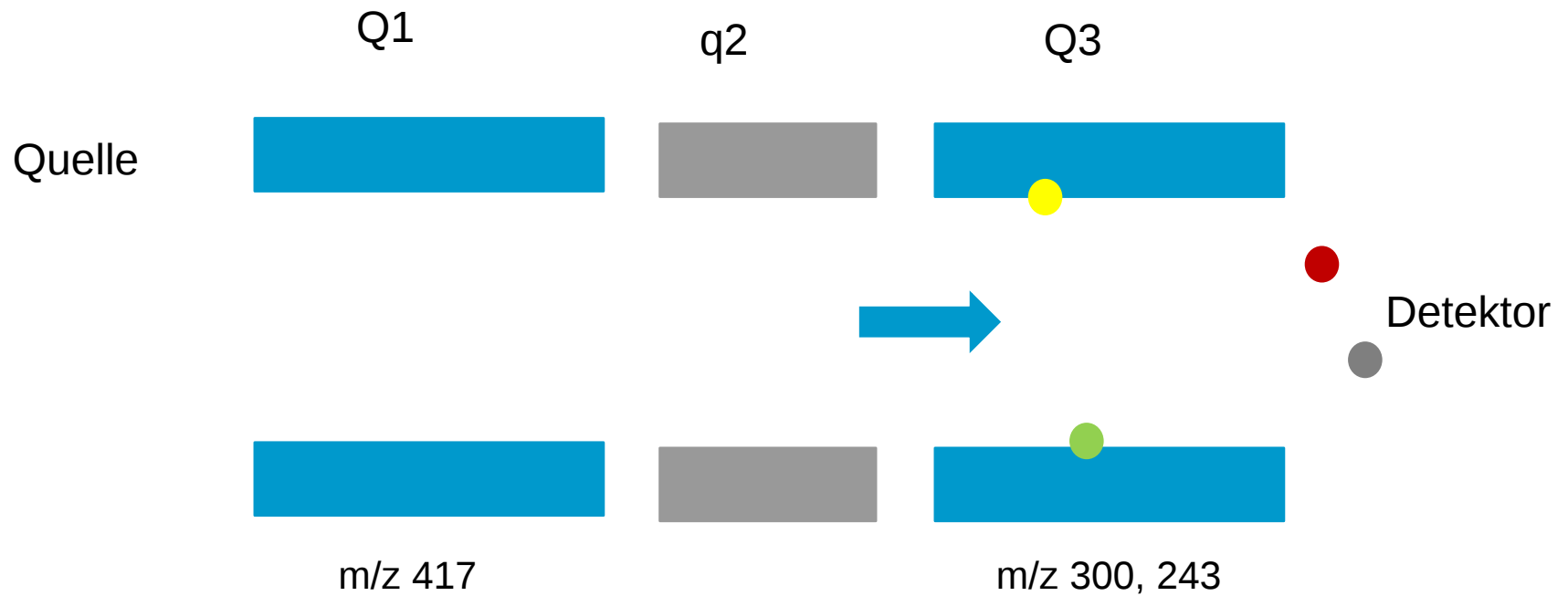
Niedrige Nachweisgrenzen und hohe Selektivität

Triple-Quadrupol

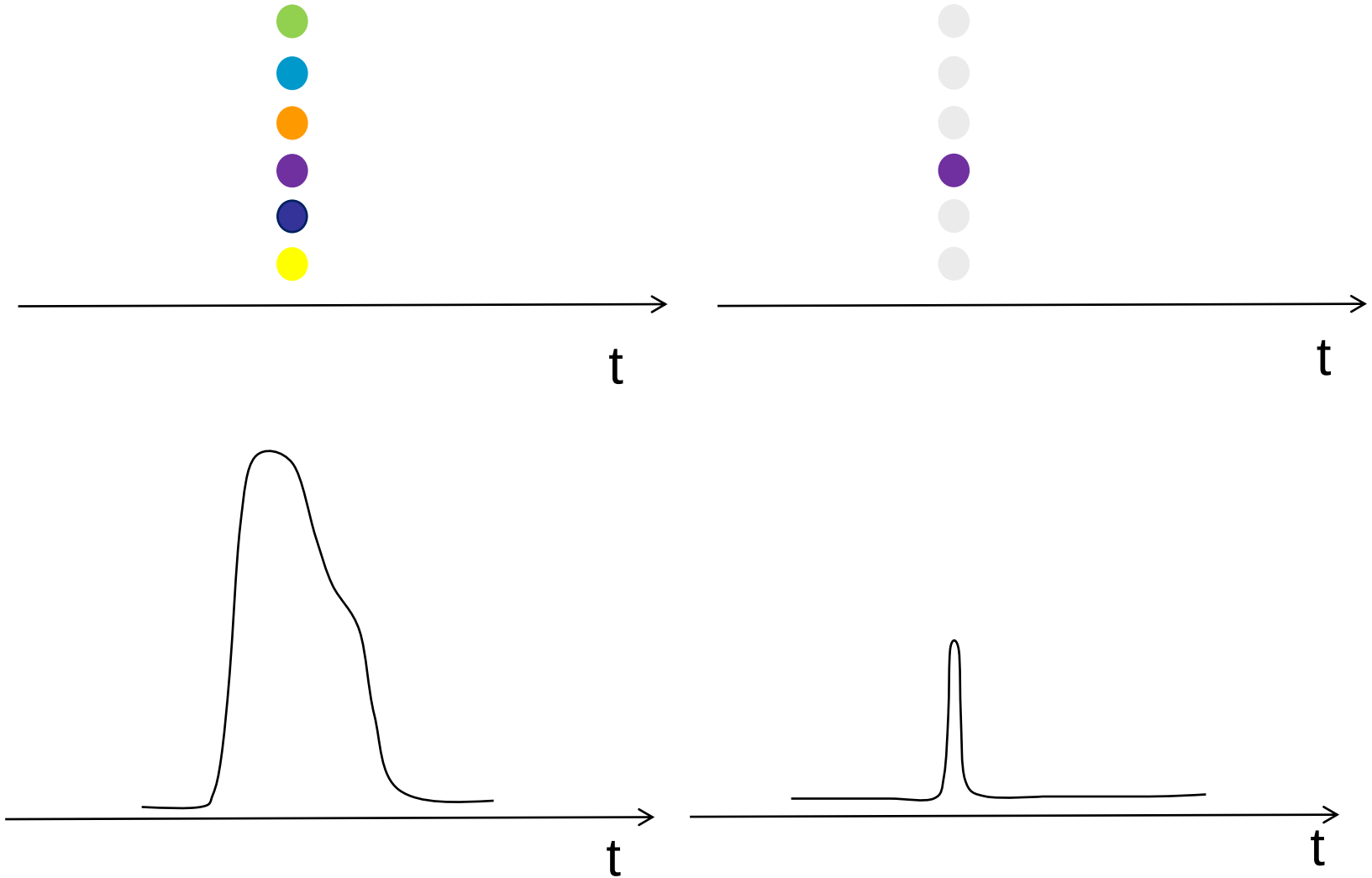


Niedrige Nachweisgrenzen und hohe Selektivität

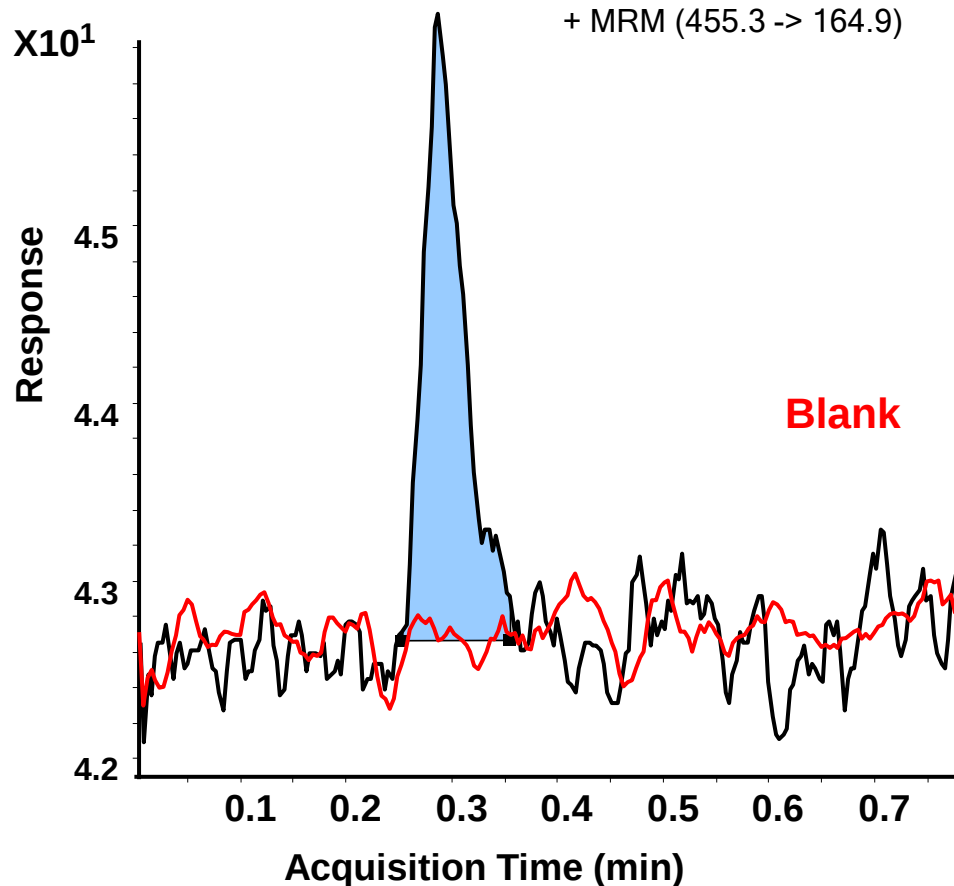
Triple-Quadrupol



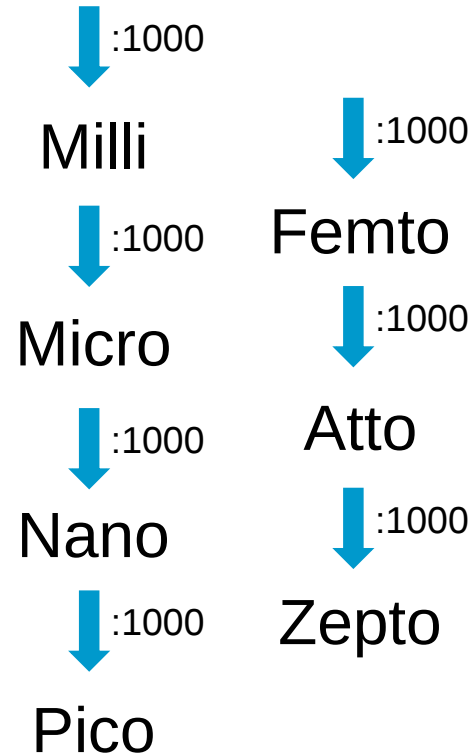
Niedrige Nachweisgrenzen und hohe Selektivität



Das Agilent 6490 Triplequadrupol-MS erreicht Nachweisgrenzen im zeptomolaren Bereich 100 Attogramm Verapamil on-column (200 Zeptomol)



Grundeinheit



200 Zeptomol sind ca. 120000 Teilchen



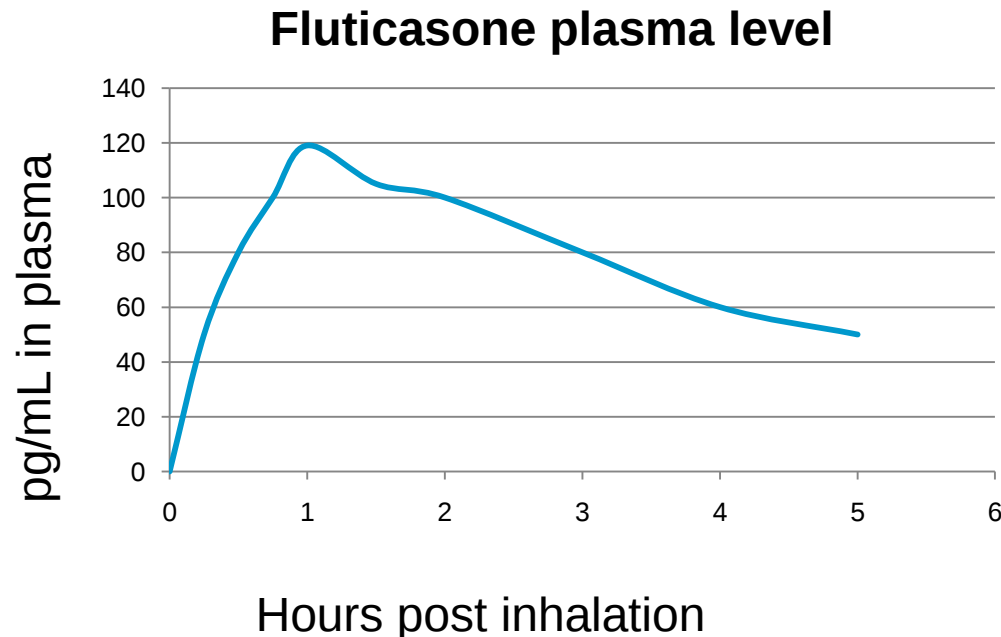
Niedrige Nachweisgrenzen und hohe Selektivität

Beispiel: Analyse von Fluticasonpropionat



Fluticasonpropionat

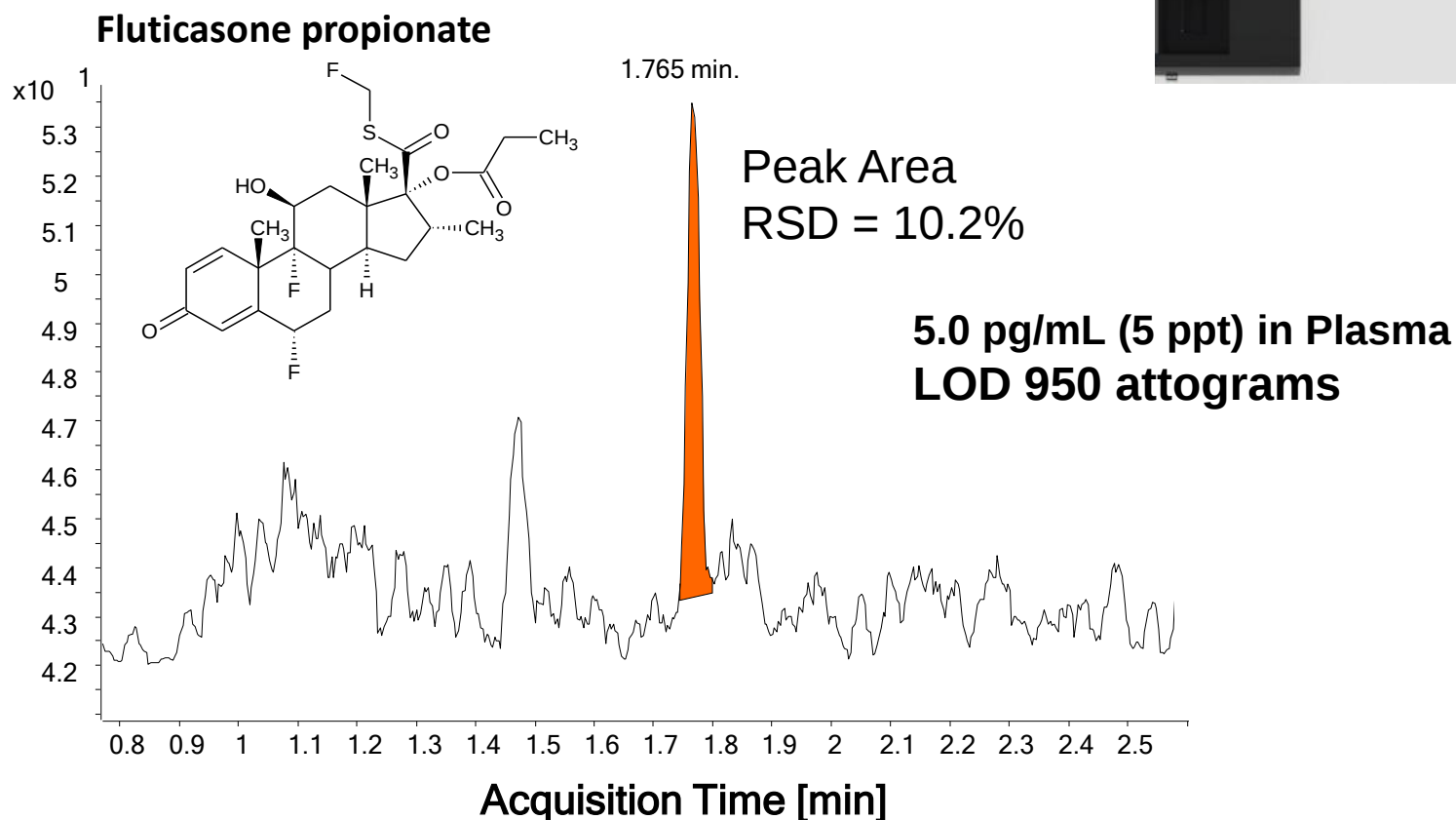
Gehört zu den Glucocorticoiden und wirkt entzündungshemmend und immunsuppressiv. Wird als Nasenspray zur Behandlung von allergischem Schnupfen bei Erwachsenen und Kindern über 4 Jahren eingesetzt



Niedrige Nachweisgrenzen und hohe Selektivität

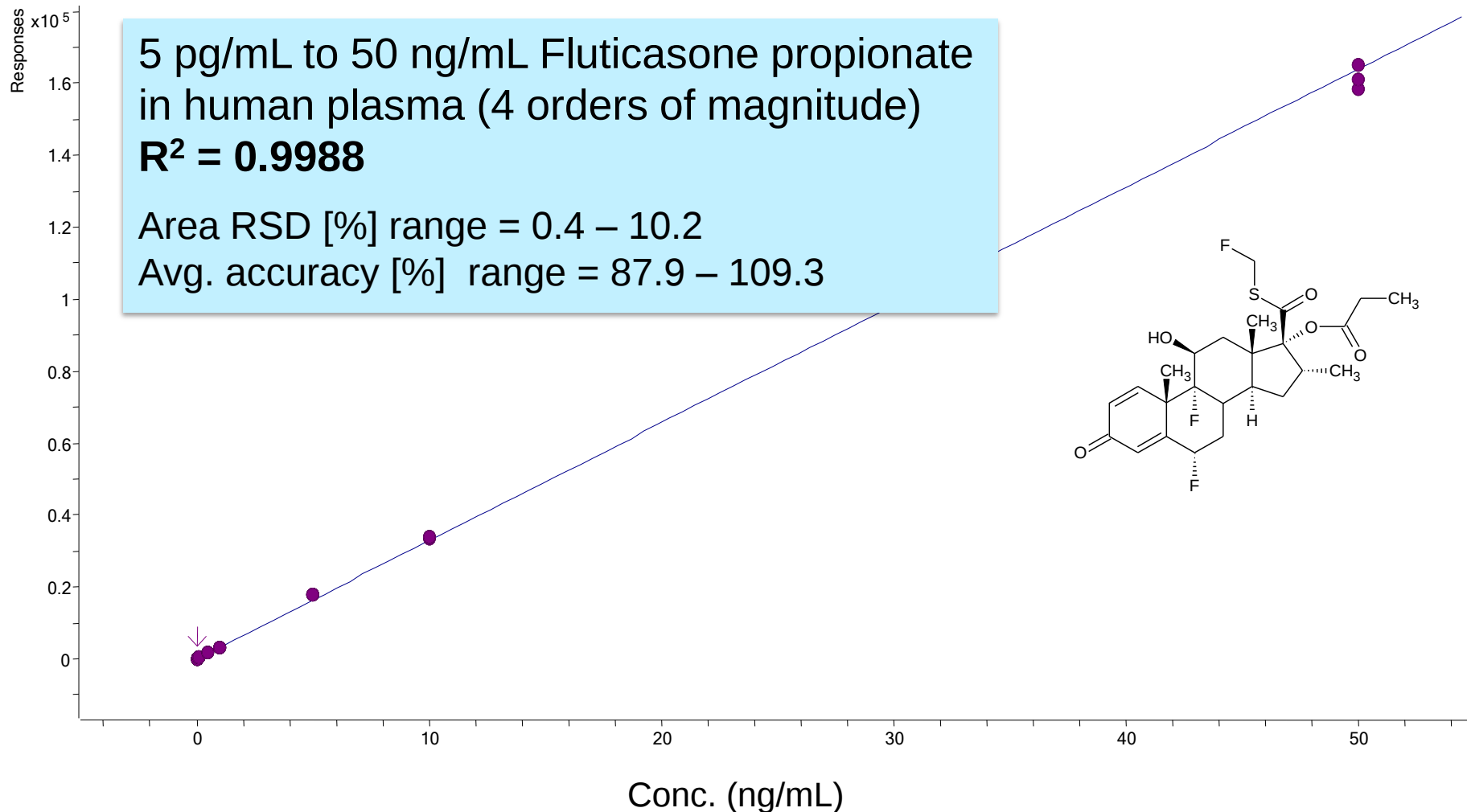
Beispiel: Analyse von Fluticasonpropionat

Proteinfällung- “*dilute and shoot*”-Methode



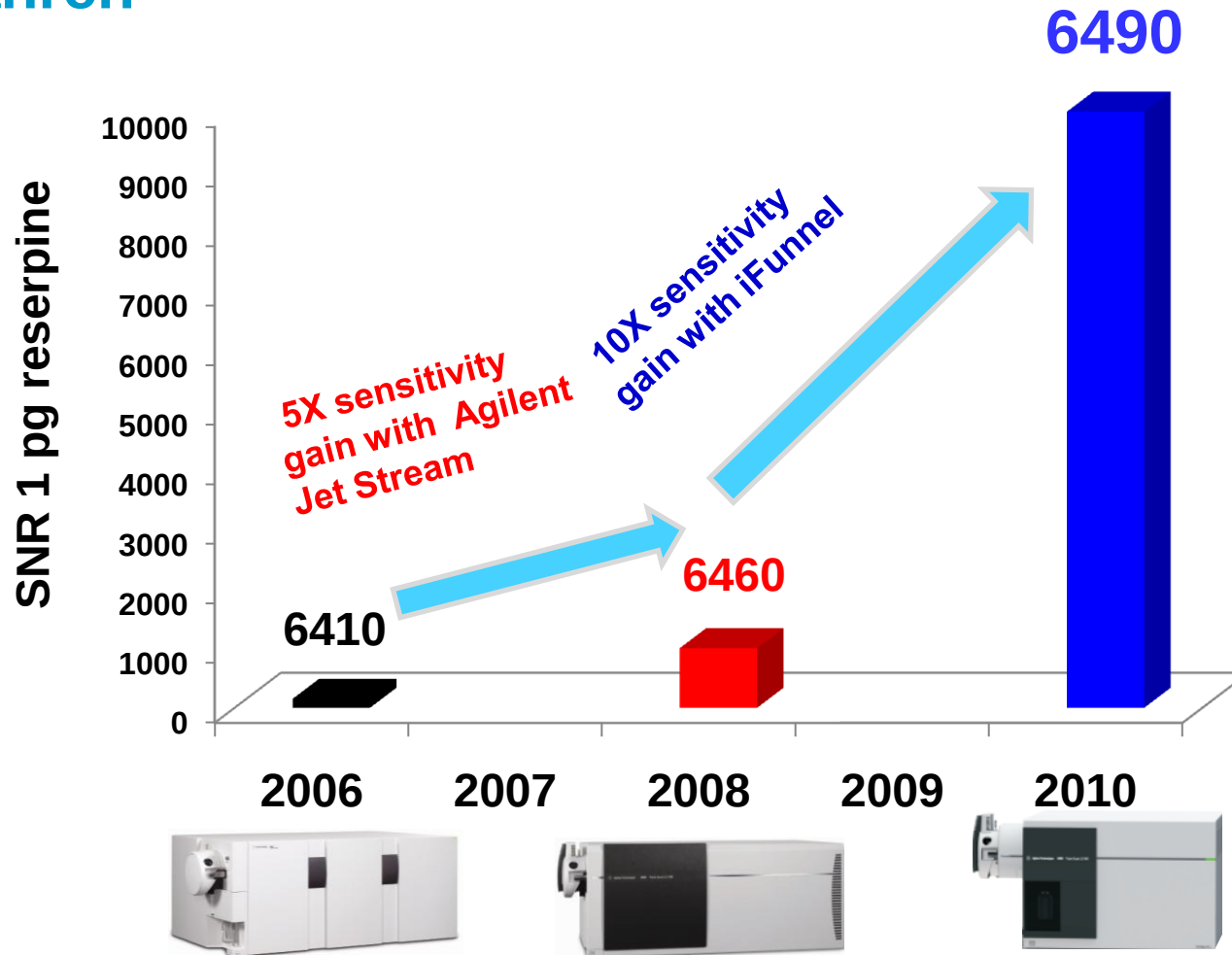
Niedrige Nachweisgrenzen und hohe Selektivität

Beispiel: Analyse von Fluticasonpropionat



Wie erreicht man solche Nachweisgrenzen?

Agilent QQQs: 50 fache Steigerung der Empfindlichkeit in 4 Jahren

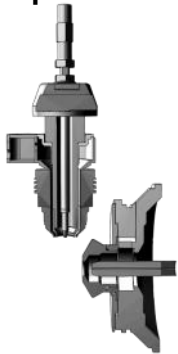


Wie erreicht man solche Nachweisgrenzen?

iFunnel Technologie: 6x mehr Ionen erreichen das Hochvakuum

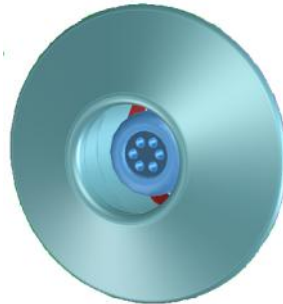
Agilent Jet Stream

- Thermische Eingrenzung des ESI Spraykonus
- Effiziente Desolvatisierung zur Freisetzung der Ionen in die Gasphase



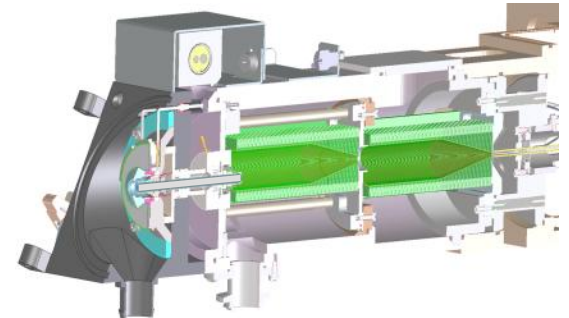
Hexabore Capillary

- 6-facher Gastransport
- Annähernd vollständige Entleerung des Gasraums der Quelle



Dual Ion Funnel

- Entfernt Gas und sammelt die Ionen
- Reduziert neutralen Hintergrund
- Erhöht die Lebensdauer der Turbopumpen



Agilent Jet Stream

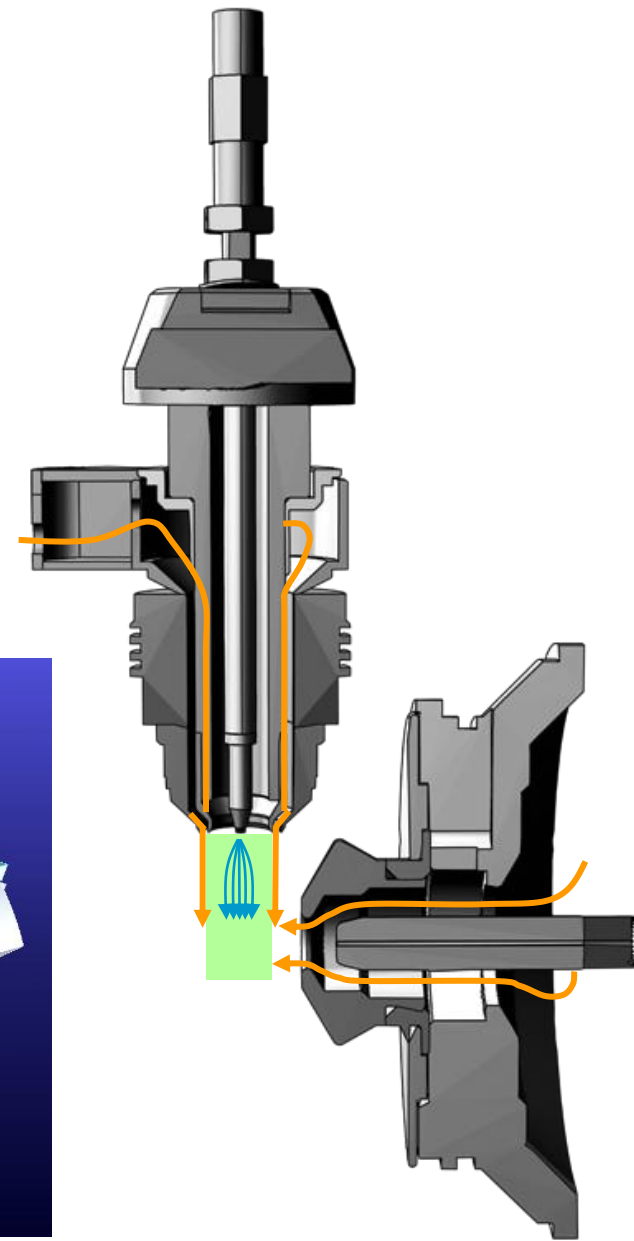
Thermal Gradient Focusing Technology

Empfindlichkeitsgewinn für TOF, Q-TOF, und Triple Quad

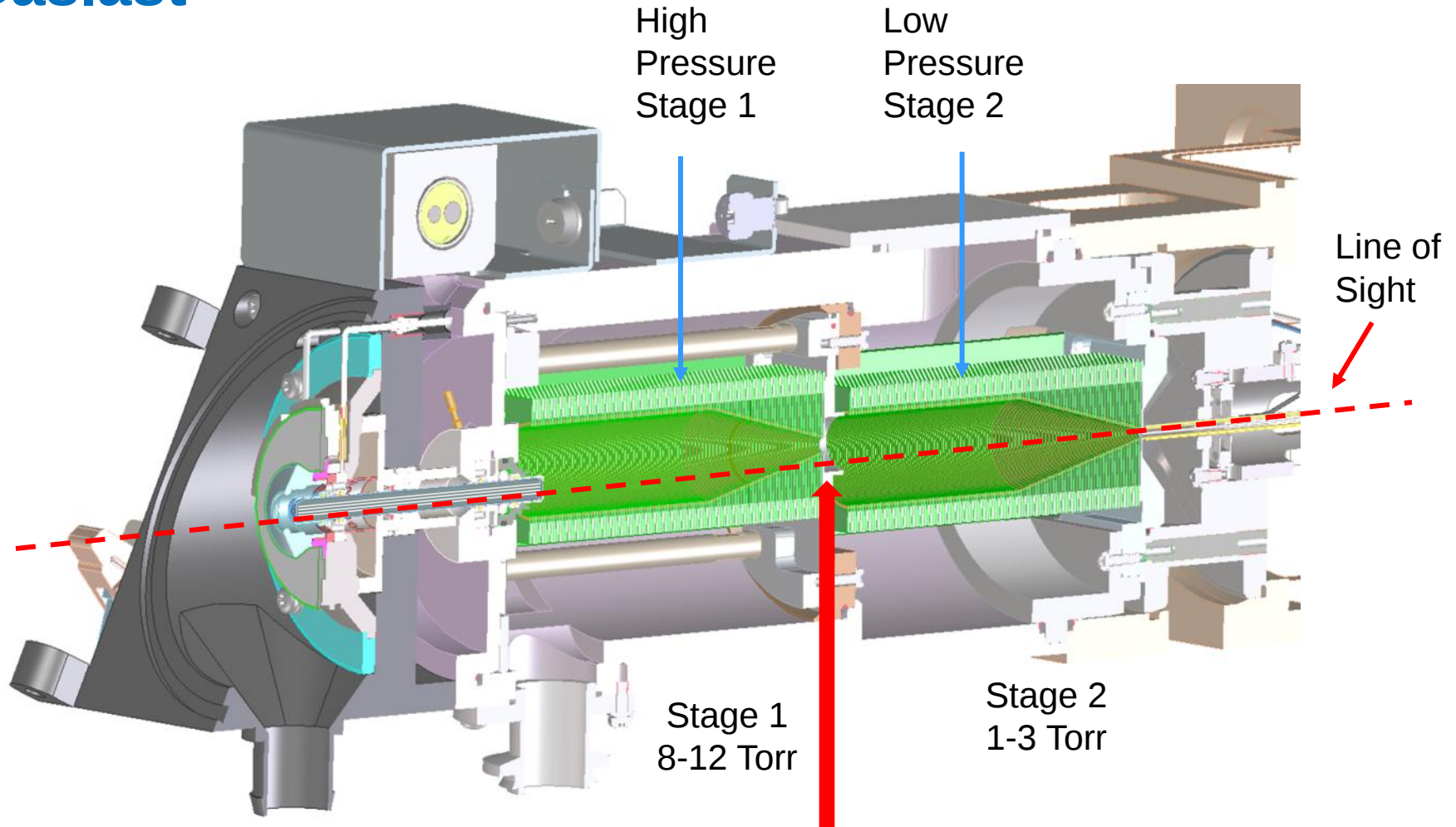
Fokussierung der Ionen in einer thermisch begrenzten Zone der Quelle

Verbesserte Effizienz der Ionisierung und des Ioneneintrages

Wirksam für die meisten ESI Analyten, wie auch für viele APCI Substanzklassen

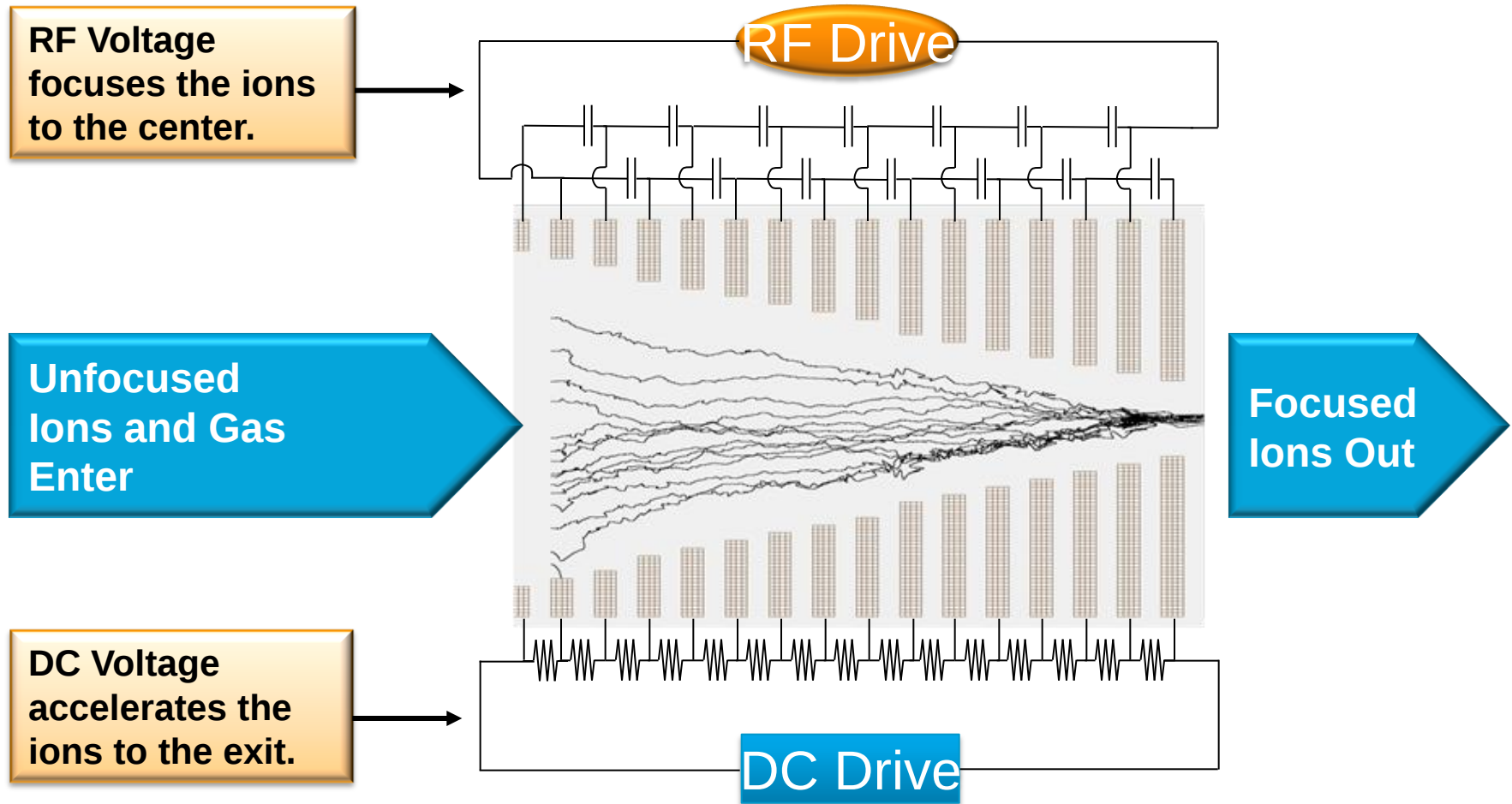


Zweistufiger Ion Funnel verarbeitet die hohe Gaslast



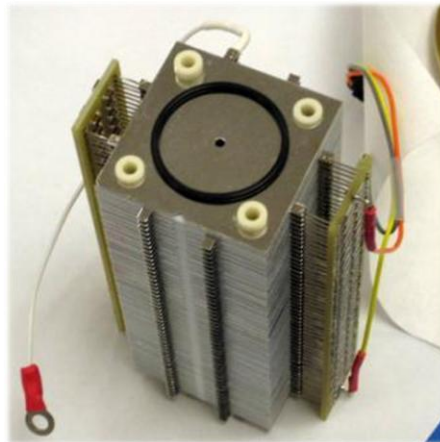
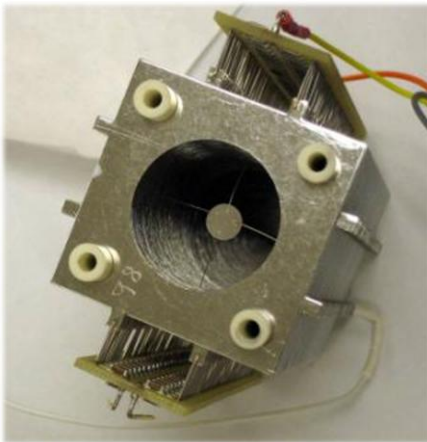
Stufe der Ion Funnels verhindert den Eintrag von Neutralteilchen in das MS

Ion Funnel Betrieb

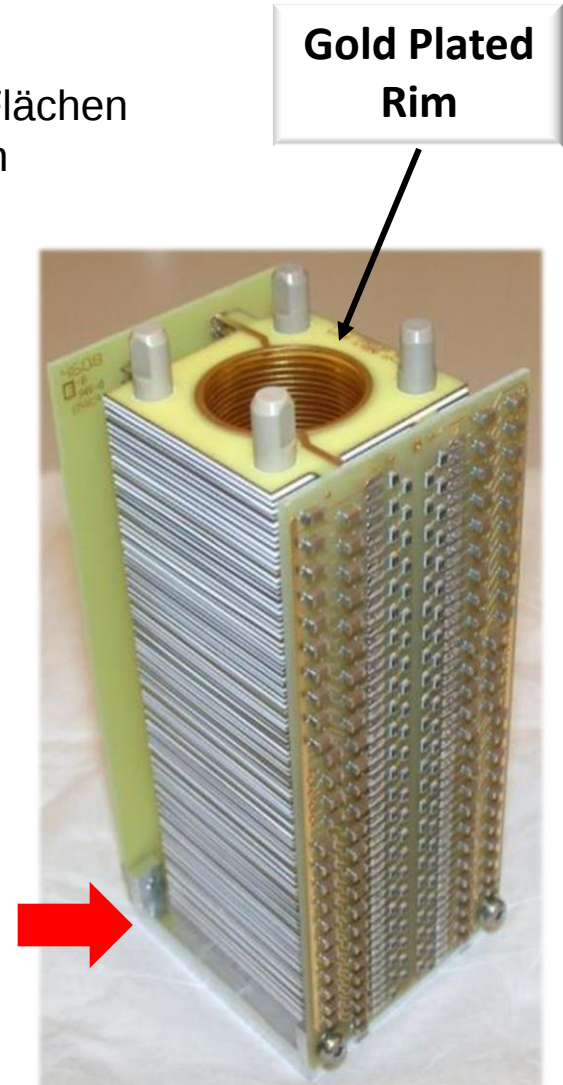


Ion Funnel Bauweise

Bisher machten viele Metallplatten wegen grosser aktiver Flächen eine häufige Reinigung nötig. Hohe Kapazitäten erforderten grosse, teure Netzteile

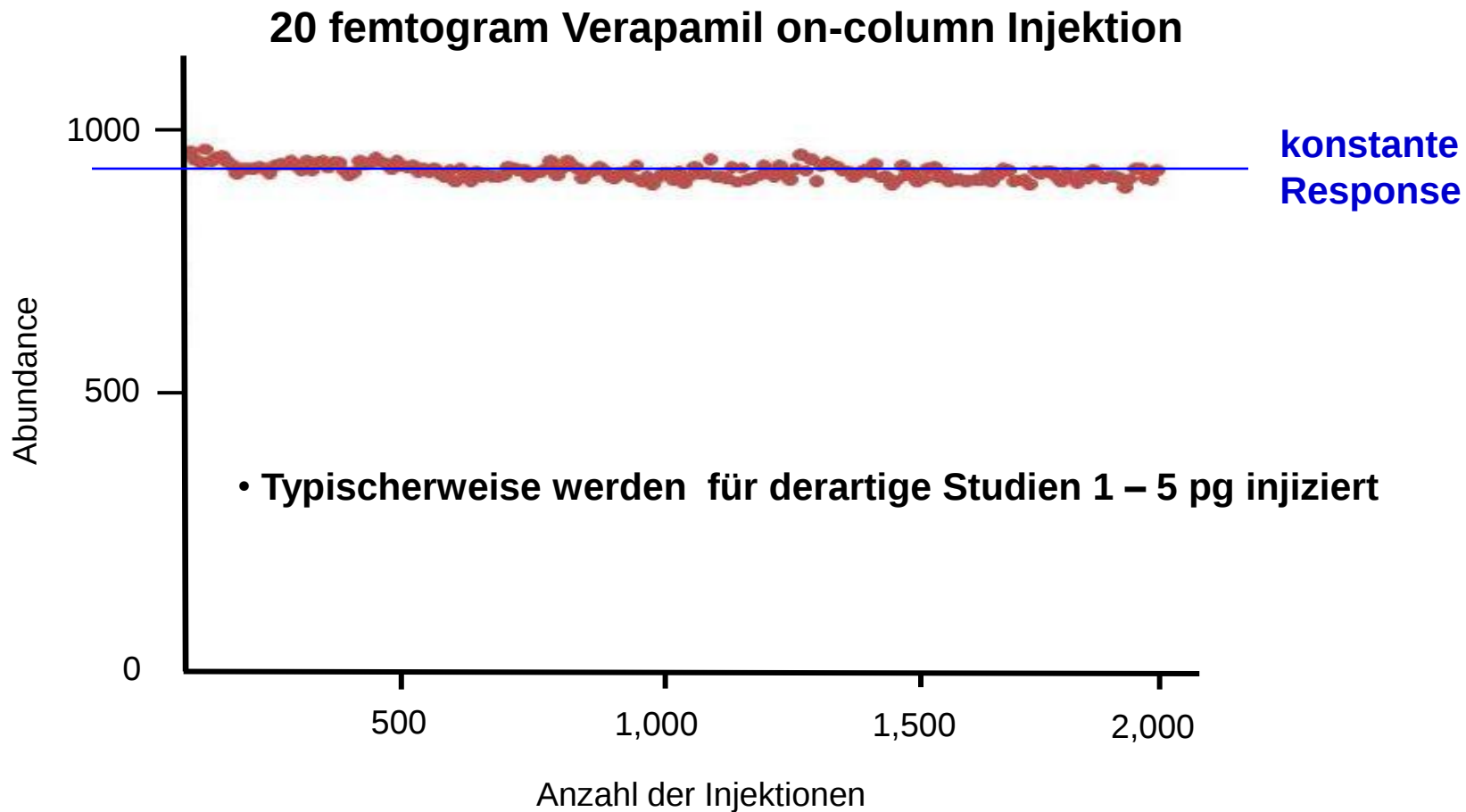


Das 6490 Design nutzt Platinen Technologie um die aktiven Oberflächen stark zu reduzieren. Kleine Kapazitäten ermöglichen schnelle Polaritätswechsel trotz Netzteile vernünftiger Grösse



6490 Performance: Über 2000 Proben

Protein gefälltes Plasma über 4 Tage mit 5% RSDs



Einsatzgebiete der LC/MS(MS)

Wenn hohe Anforderungen an

die Nachweisgrenze

die Geschwindigkeit

die Selektivität

den Informationsgehalt

gestellt werden, ist ein MS der Detektor der Wahl.
Warum???

Was hat Selektivität mit Geschwindigkeit zu tun?

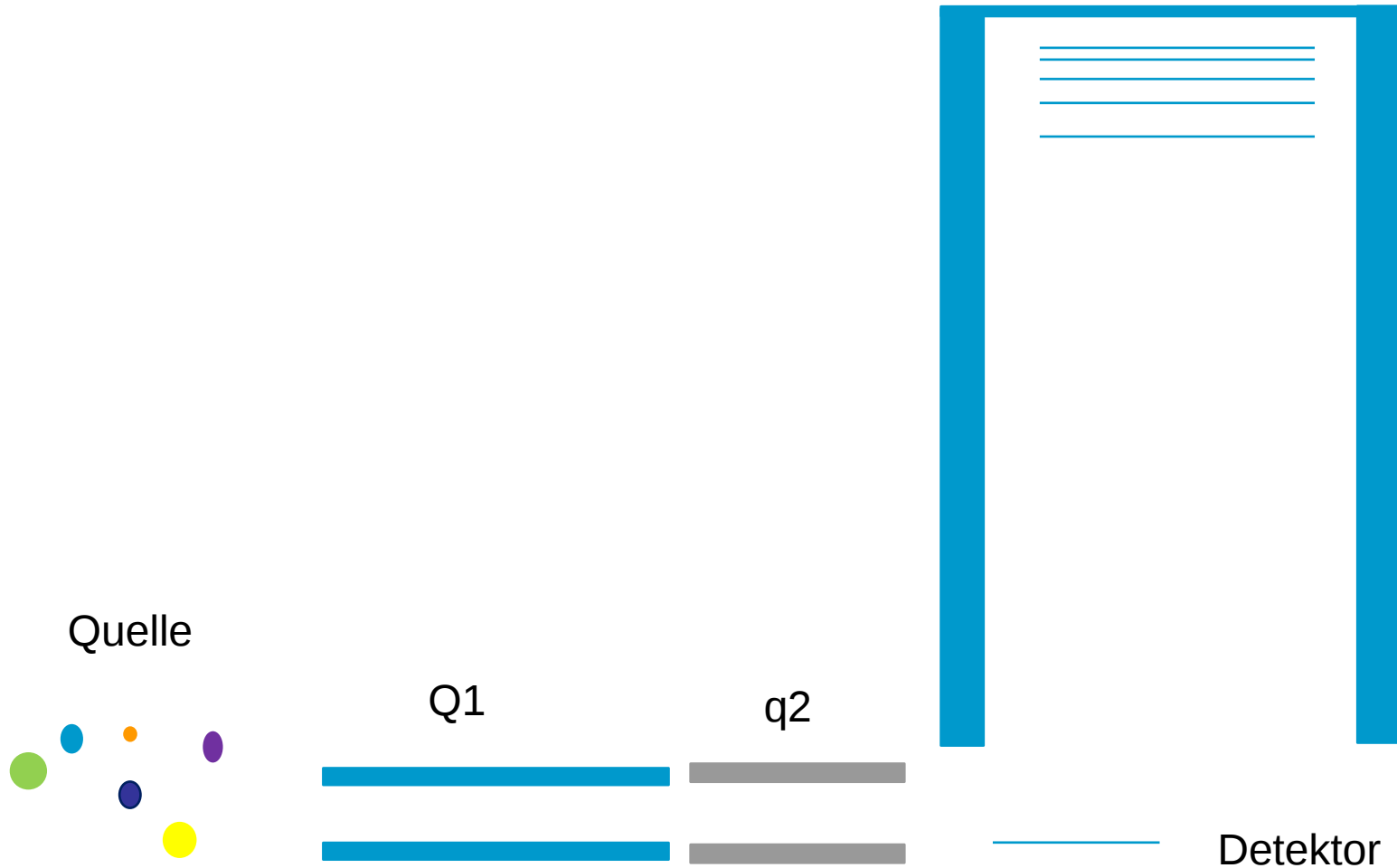
Je schneller die Chromatographie, je höher die Anzahl der Analyten, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit alle Analyten chromatographisch zu trennen. Ist der Detektor selektiv genug, können die Substanzen dennoch bestimmt werden.

Als Massenspektrometer eignen sich hier Triplequadrupole und **(Q)-TOFs**.



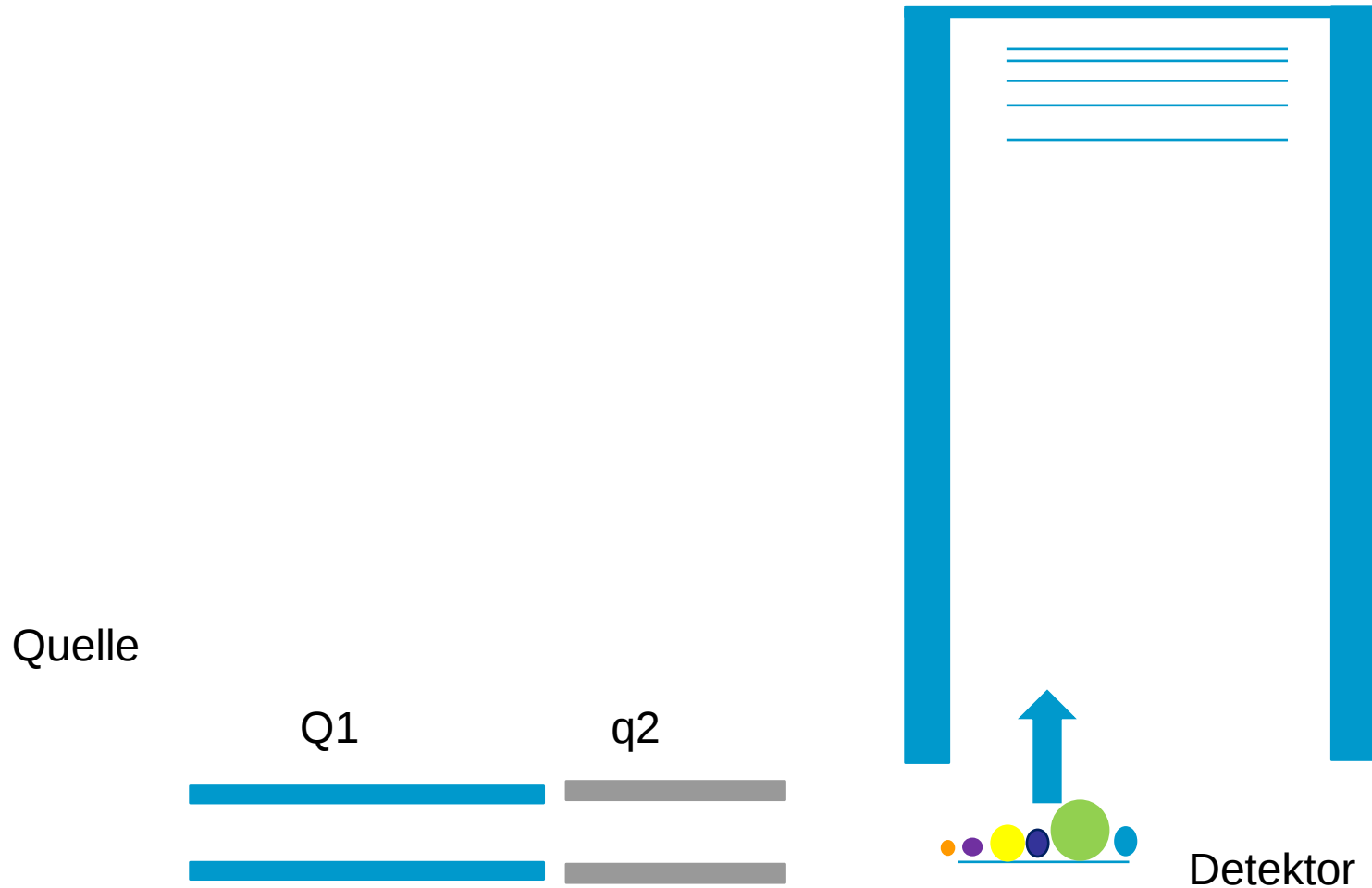
Selektivität und Geschwindigkeit

(Q)-TOF-Massenspektrometer



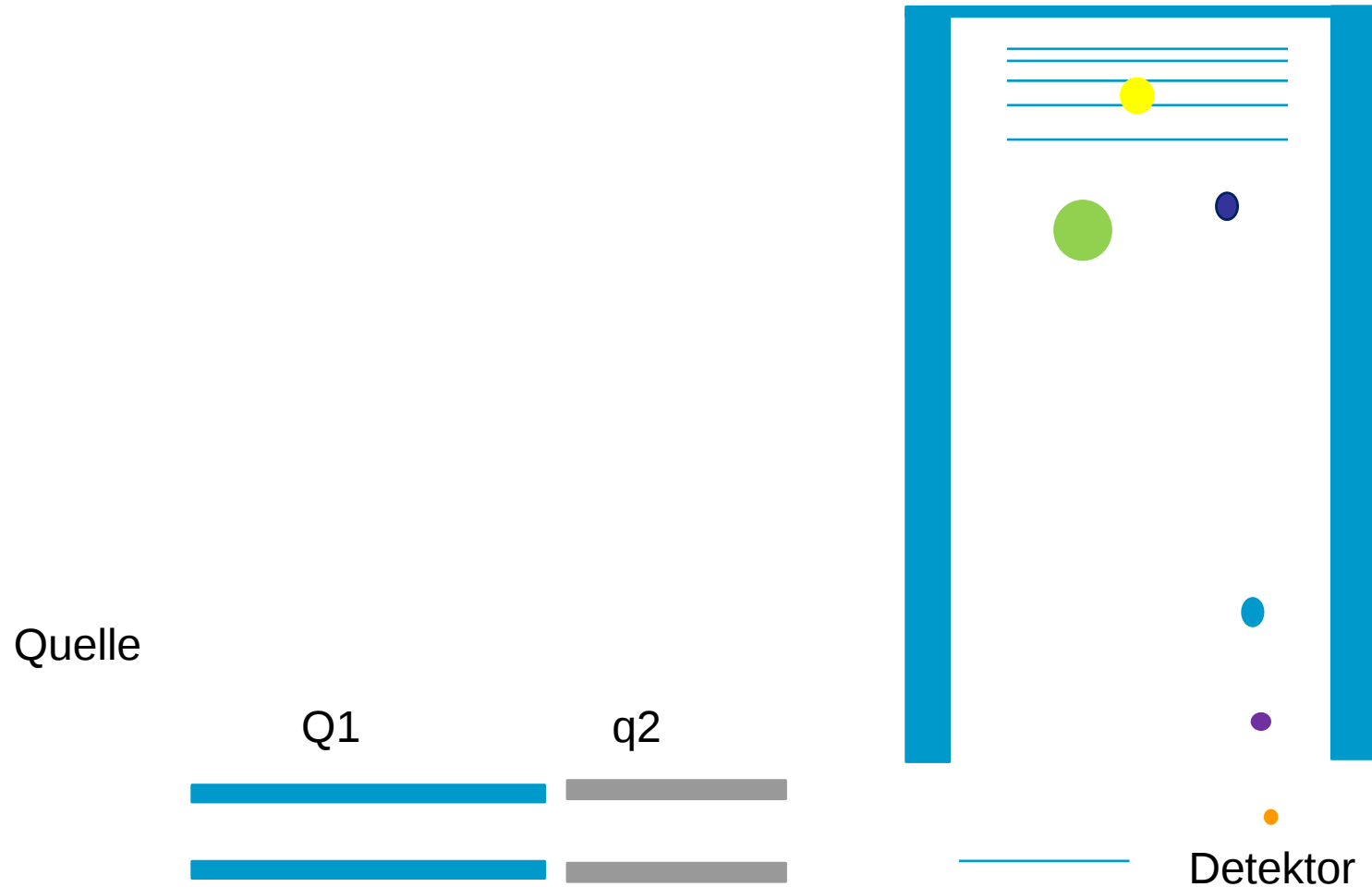
Selektivität und Geschwindigkeit

(Q)-TOF



Selektivität und Geschwindigkeit

(Q)-TOF



Selektivität und Geschwindigkeit: Eigenschaften von (Q)-TOF-Massenspektrometern

1. Schnelle „Scanrate“ (bis 20 Spektren / Sekunde)

Ermöglicht schnelle Chromatographie mit hoher chromatographischer Auflösung

2. Hohe Auflösung der Massenspektren

Erleichtert die Unterscheidung von Komponenten mit der gleichen nominellen Masse aber unterschiedlicher Elementarzusammensetzung

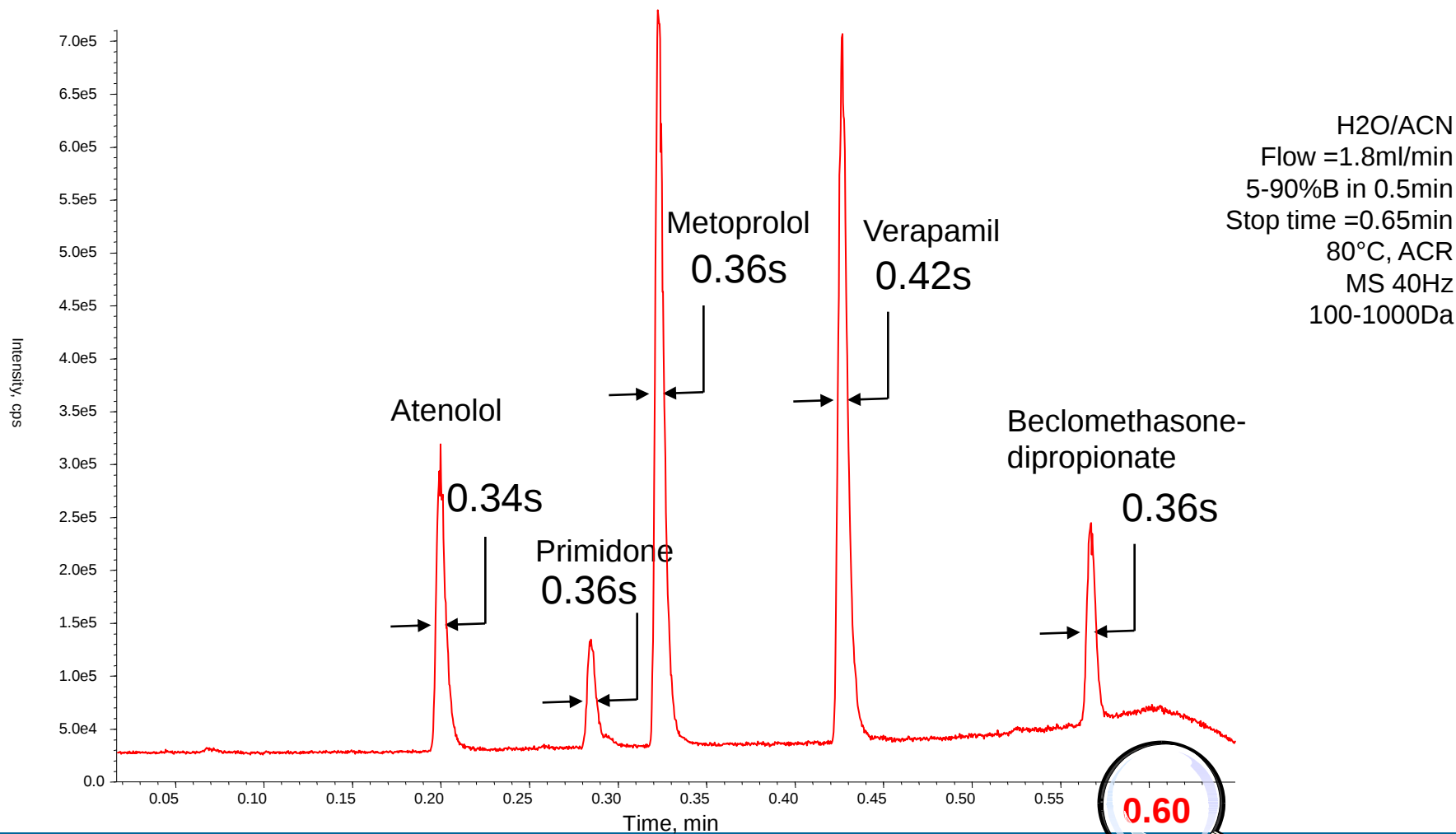
3. Hohe Massengenauigkeit

Ermöglicht die Bestimmung der molekularen Zusammensetzung eines Ions

4. MS/MS-Fähigkeit (nur Q-ToF)

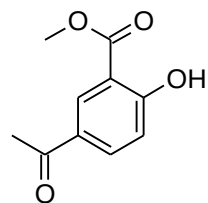
MS/MS-Spektren liefern Strukturinformationen und erleichtern die Identifizierung

Selektivität und Geschwindigkeit: Schnelle Analyse pharmazeutischer Wirkstoffe



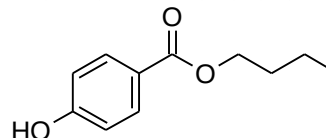
Einfluss von Auflösung und Massengenauigkeit

Co-eluierende Substanzen gleicher nomineller Masse



Methyl 5-acetyl-salicylate (MAS)

$[M+H]^+$ 195.065185



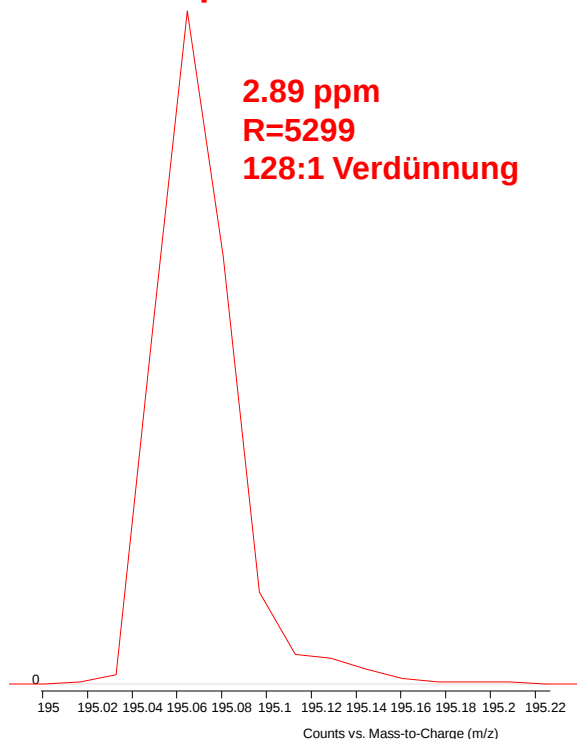
Butyl paraben (BP)

$[M+H]^+$ 195.101571

MAS konstant, BP wird verdünnt

1 GHz Acquisition

2.89 ppm
R=5299
128:1 Verdünnung



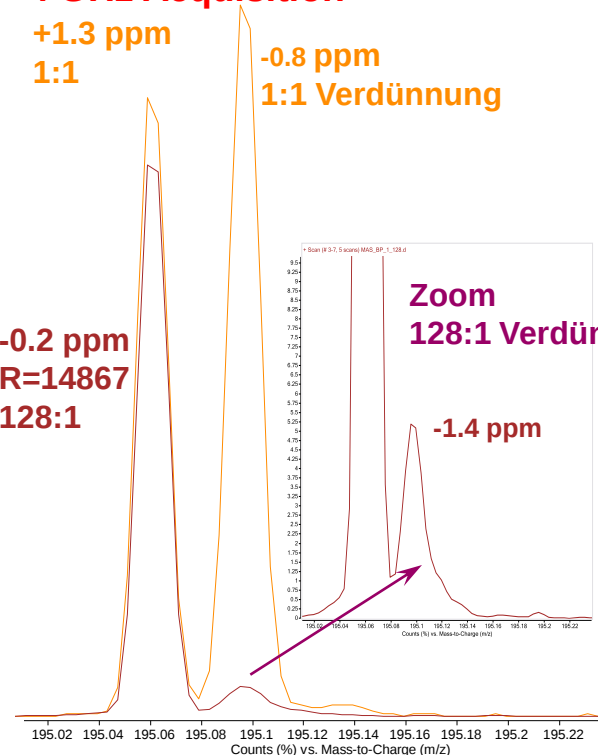
Verdünnung	1GHz MAS Mass Error (ppm)	4GHz MAS Mass Error (ppm)
128:1	2.9	-0.2
64:1	3.3	
32:1	5.1	
16:1	10.1	
8:1	17.1	
4:1	33.2	
2:1	64.1	
1:1	120.5	1.3

4 GHz Acquisition

+1.3 ppm
1:1

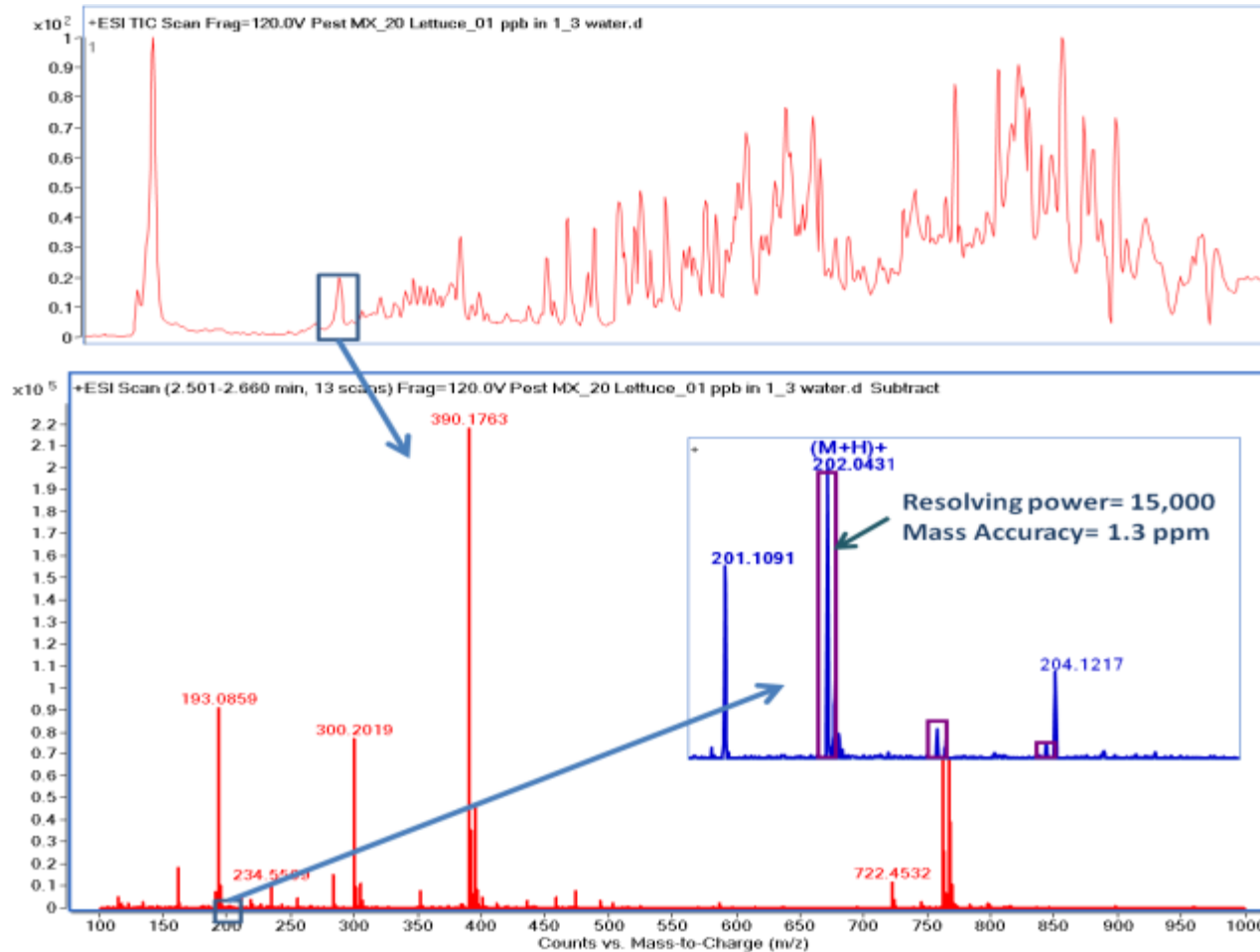
-0.8 ppm
1:1 Verdünnung

-0.2 ppm
R=14867
128:1



Agilent Technologies

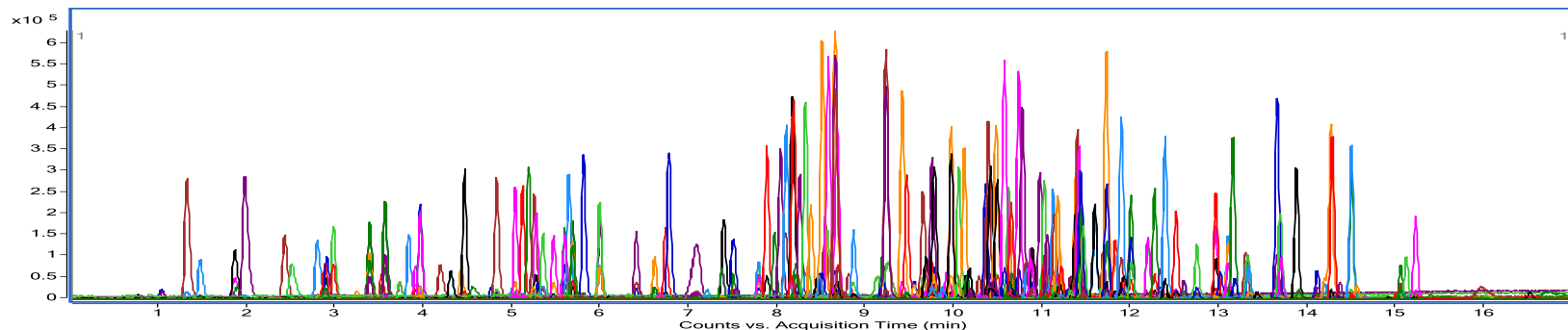
Selektivität und Geschwindigkeit: Pestizidscreening in Kopfsalat-Matrix



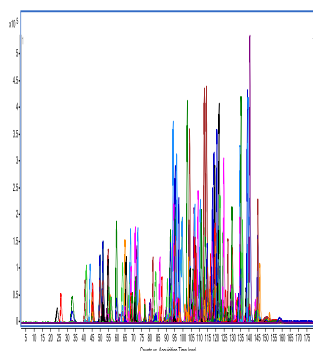
Thiabendazole and its isotopes are detected at 0.1 ppb concentration levels

Selektivität und Geschwindigkeit: 250 Pestizide, 50 pg on column

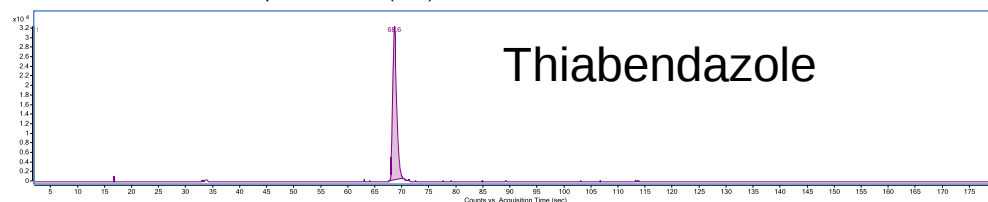
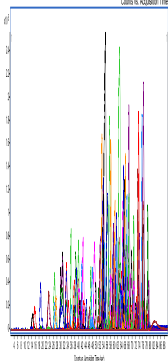
17 min.



3 min.

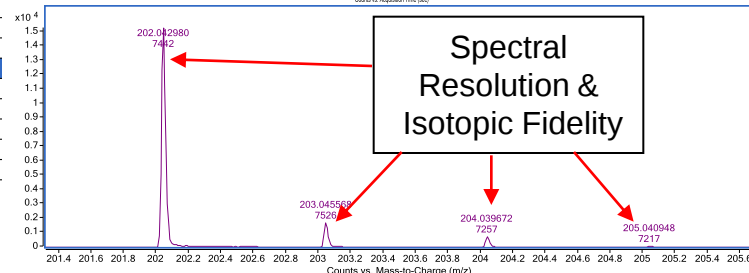
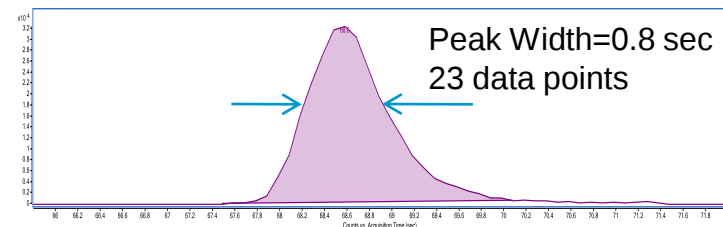


1.5 min.



Compound List					
Cpd	Name	RT	Mass	DW (Tgt. ppm)	DW (Tgt. mDa)
191	Tebufenpyrad	123	333.1613	1.43	0.48
174	Tebupirimfos	138	318.1172	1.65	0.52
145	Tebupirimfos oxone	107.1	302.1397	0.36	0.11
77	Tebuthiuron	81.7	228.1044	-0.21	-0.05
115	Terbufos	120	288.0437	-1.59	-0.46
74	Terbufos	97.7	225.1589	-0.05	-0.01
28	Terbutylazine-desethyl	54.7	201.0788	3.46	0.7
91	Terbutyn	112.8	241.1362	0.5	0.12
215	Tetraconazol	110.8	371.0216	0.24	0.09
25	Thiabendazole	68.6	201.0357	-1.81	-0.36
94	Thiabendazole	77	252.0233	-1.38	-0.35
118				0.08	
127				-11.66	
167				-0.16	
169	Tribufos	146.3	314.0964	0.76	0.24
161	Triuracil	77	184.0794	-1.97	-1.17

-1.8 ppm



Agilent Technologies

Einsatzgebiete der LC/MS(MS)

Wenn hohe Anforderungen an

die Nachweisgrenze

die Geschwindigkeit

die Selektivität

den Informationsgehalt

gestellt werden, ist ein MS der Detektor der Wahl.
Warum???

Informationsgehalt

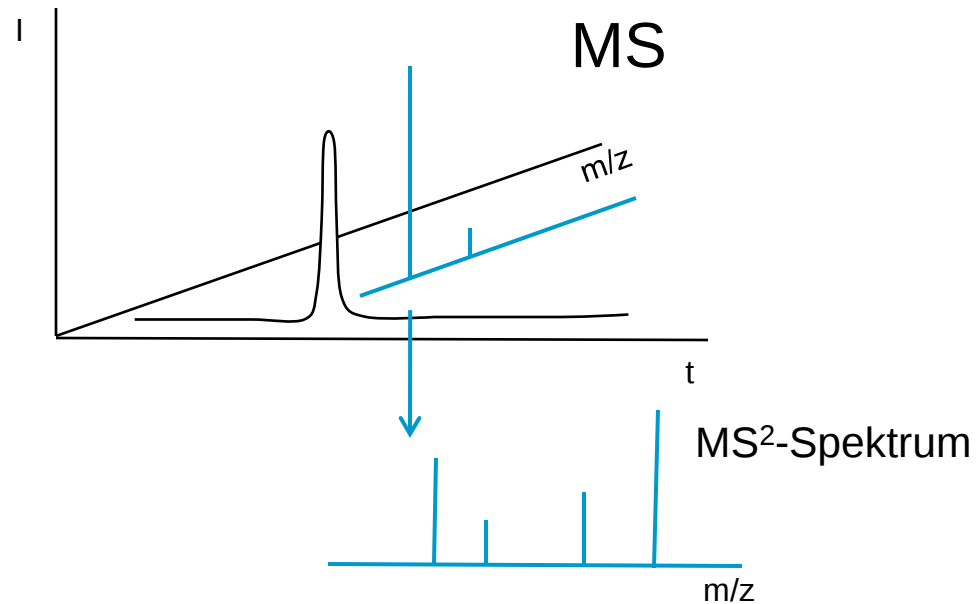
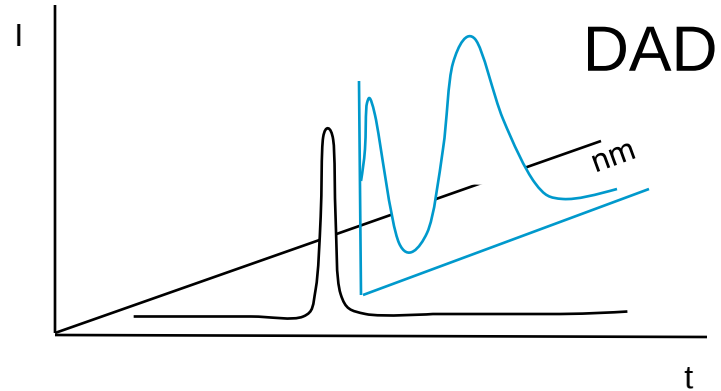
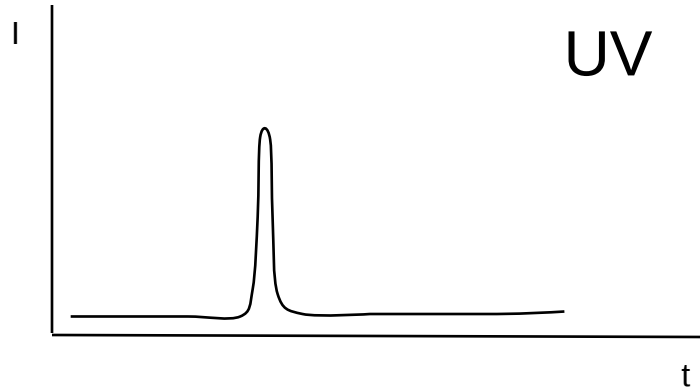
Jedes Massespektrometer liefert Informationen zur nominellen Masse eines Ions.

Mit Hilfe hochauflösender Geräte (wie TOFs), ist man zusätzlich in der Lage aus der gemessenen Masse eine Summenformel zu bestimmen.

LC/MS liefert informationsarme Spektren, in der Regel protonierte und deprotonierte Molekülionen. Durch MS/MS-Experimente können zusätzliche Strukturinformationen gewonnen werden.

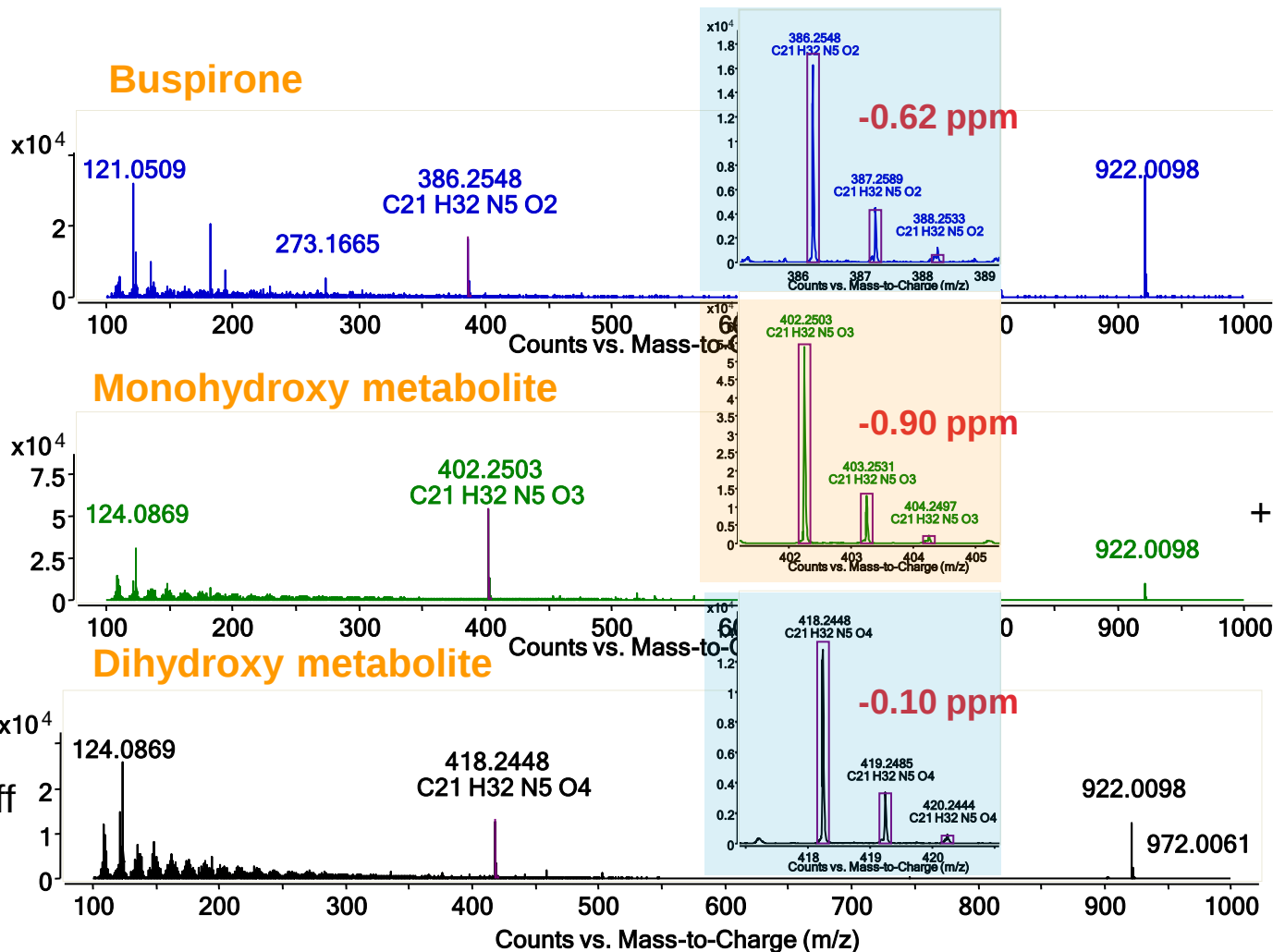


Informationsgehalt Mehrdimensionale Daten



Informationsgehalt

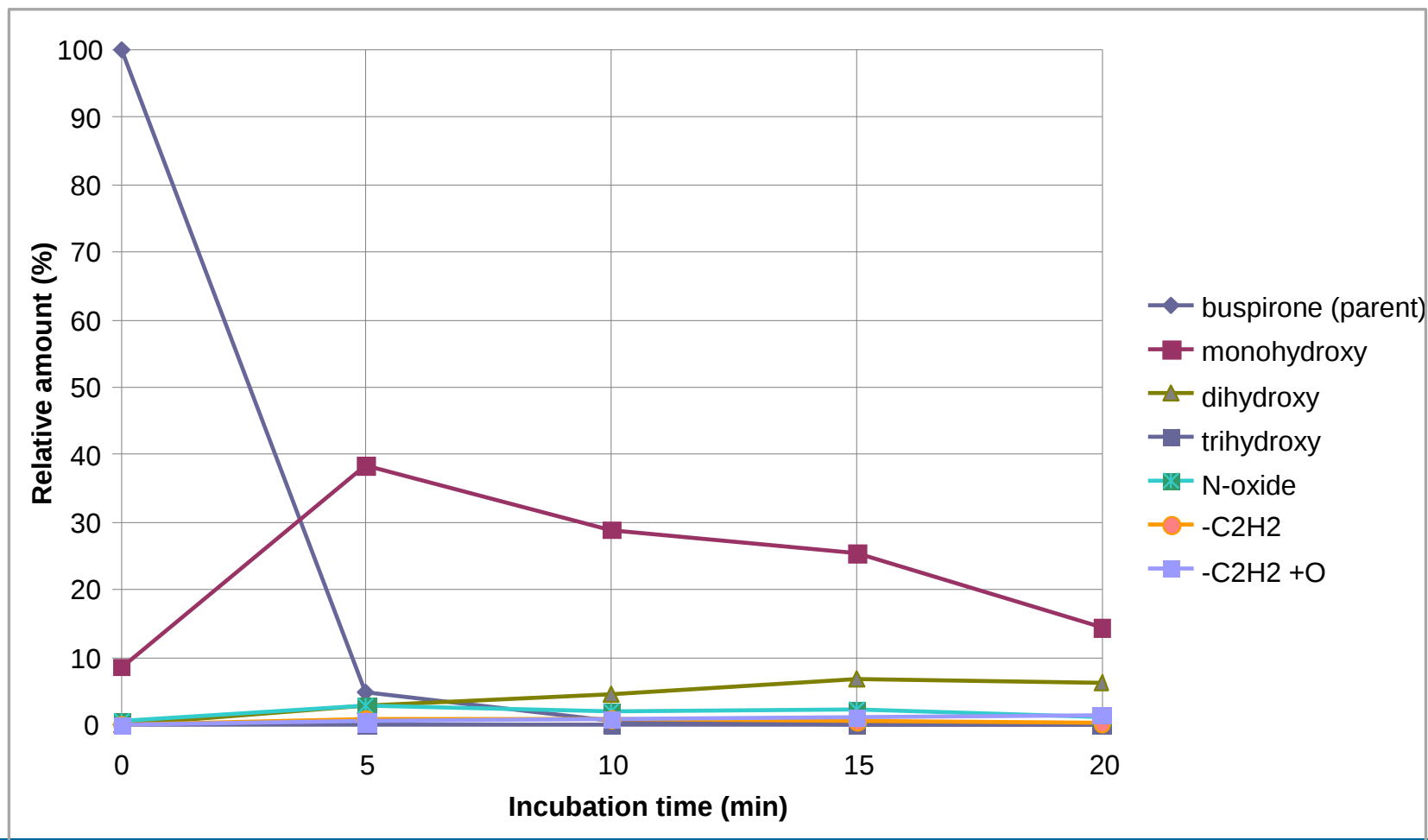
Bestimmung von Metaboliten



Informationsgehalt

Bestimmung von Metaboliten

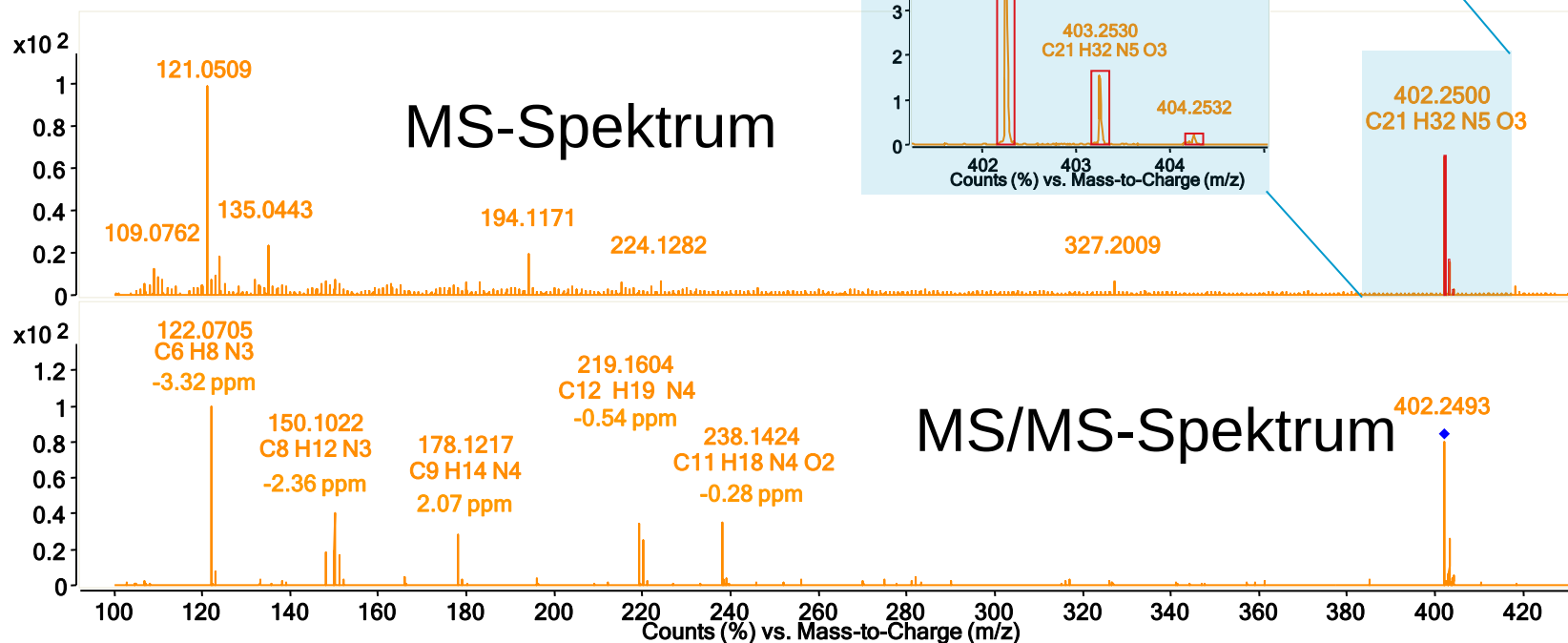
Profil der Metabolisierung



Informationsgehalt

Bestimmung von Metaboliten

Buspirone monohydroxy metabolite



Informationsgehalt

Analyse unbekannter Verbindungen mit hochauflösender MS/MS

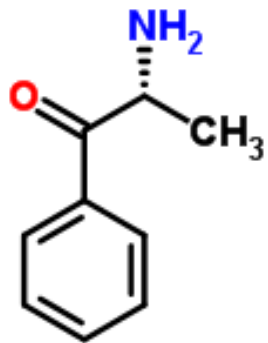
Beispiel für Strukturvielfalt: $M = 149$

Massengenauigkeit von 2 ppm = $\pm 0,0003$

Zugelassene Elemente:	Anzahl an Strukturformeln *
C, H, N, O, S, P, F, Cl, Br:	120
C, H, N, O, S, P:	38
C, H, N, O:	27

*Number of isomers according to MOLGEN
(Molecular structure generation; <http://molgen.de>)





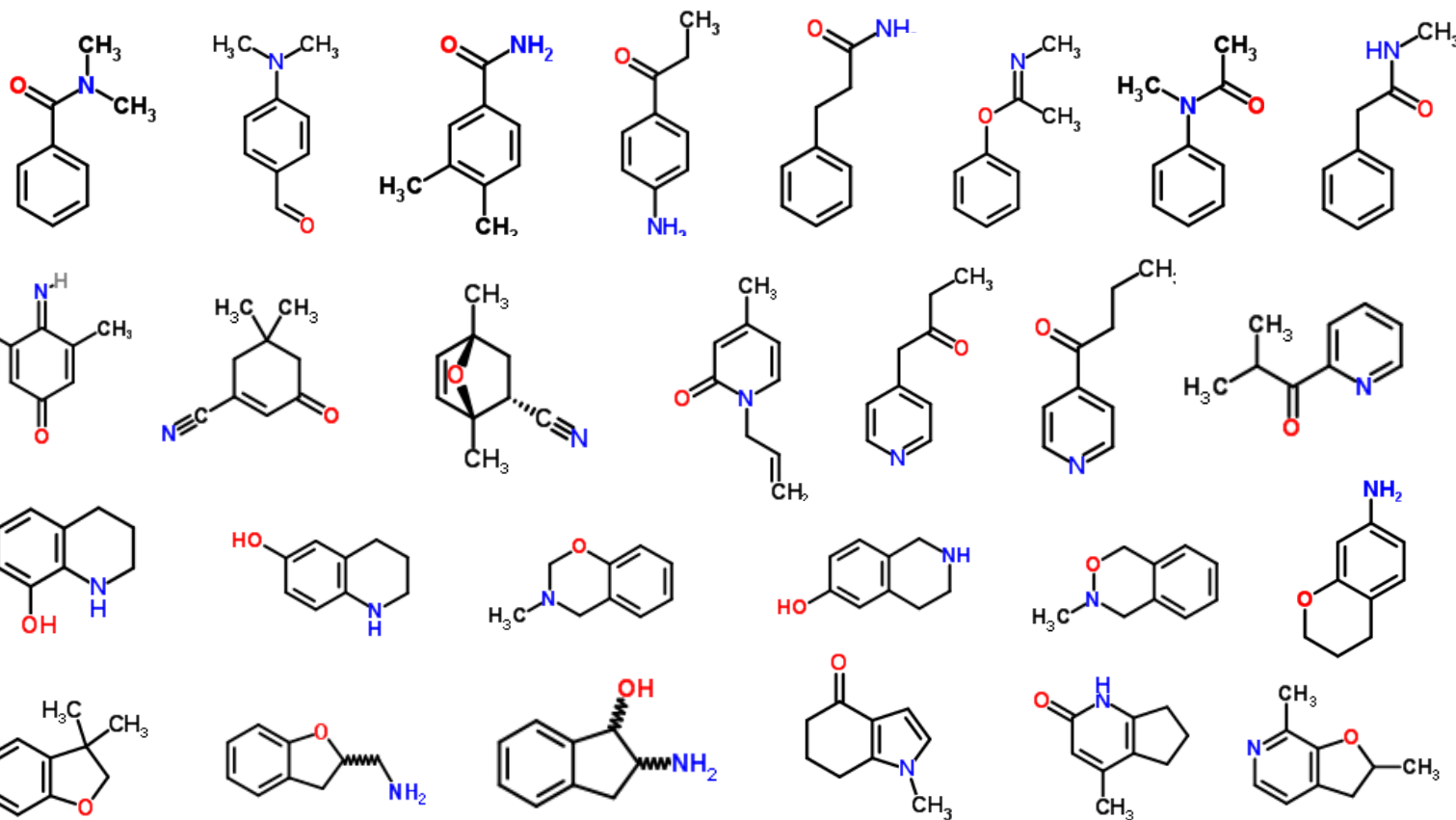
$C_9H_{11}NO$

Beispiel für Strukturisomere von Cathinon

(www.chemspider.com, 829 Treffer)

Insgesamt sind **25 895 621 Strukturisomere** möglich

(Stereoisomers kommen noch dazu!!!)



Informationsgehalt

Obwohl gerade hochauflösende LC/MS/MS-Systeme viele Informationen über ein Molekül generieren, ist aufgrund der enormen Strukturvielfalt organischer Moleküle eine Identifizierung nicht immer möglich.

Für diese braucht man oft zusätzliche analytische Methoden (wie z.B. die NMR-Spektroskopie) oder andere Hilfsmittel, wie z.B. **Spektren-Bibliotheken**.



MassHunter PCDL Manager B.04.00

Erstellen und Editieren benutzerdefinierter PCD(L)s

Single Search Results: 7200 hits

Compound Name	Formula	Mass	RT (min)	CAS	ChemSpider	IUPAC Name	Spectra #
Cocacethylen-D3	C18H20D...	320.18154					3
Cocacethylen	C18H23N...	317.16271		529-38-4	559082	Ethyl (1R,2R,3S,5S)-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylate	3
Cocain-D3	C17H18D...	306.16589					3
Cocaine	C17H21N...	303.14706		50-36-2	10194104	Methyl (1R,2R,3S,5S)-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylate	3
Codein-D3	C18H18D...	302.17097					3
Codeine	C18H21N...	299.15214		76-57-3	4447447	(5alpha,6alpha)-3-Methoxy-17-methyl-7,8-didehydro-4,5-epoxymorphinan-6-ol	3
Codeine glucuronide	C24H29N...	475.18423		20736-11-2			6
Codoxime	C20H24N...	372.16852		7125-76-0	7844721	((1(Salpha,6E)-3-Methoxy-17-methyl-4,5-epoxymorphinan-6-ylidene)amino)oxy)acetic acid	0
Coenzyme A	C21H36N...	767.11521		85-61-0	6557		0
Cofistatin	C68H79N...	1,085.565...		54063-34-2	16736899	(2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indole-3,3-diyldi-3,1-phenylene (5beta,5beta)bis(3,7,12-trioxocholan-24-o...	0
Cogazocine	C21H31NO	313.24056		57653-29-9	171872	10-(Cyclobutylmethyl)-1-ethyl-13,13-dimethyl-10-azatricyclo[7.3.1.0^{2,7}]trideca-2,4,6-trien-4-ol	0
Colchicine	C21H23N...	385.15254		477-27-0	204164	N-[1-(7S)-10-Hydroxy-1,2,3-trimethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[la]heptalen-7-yl]acetamide	0

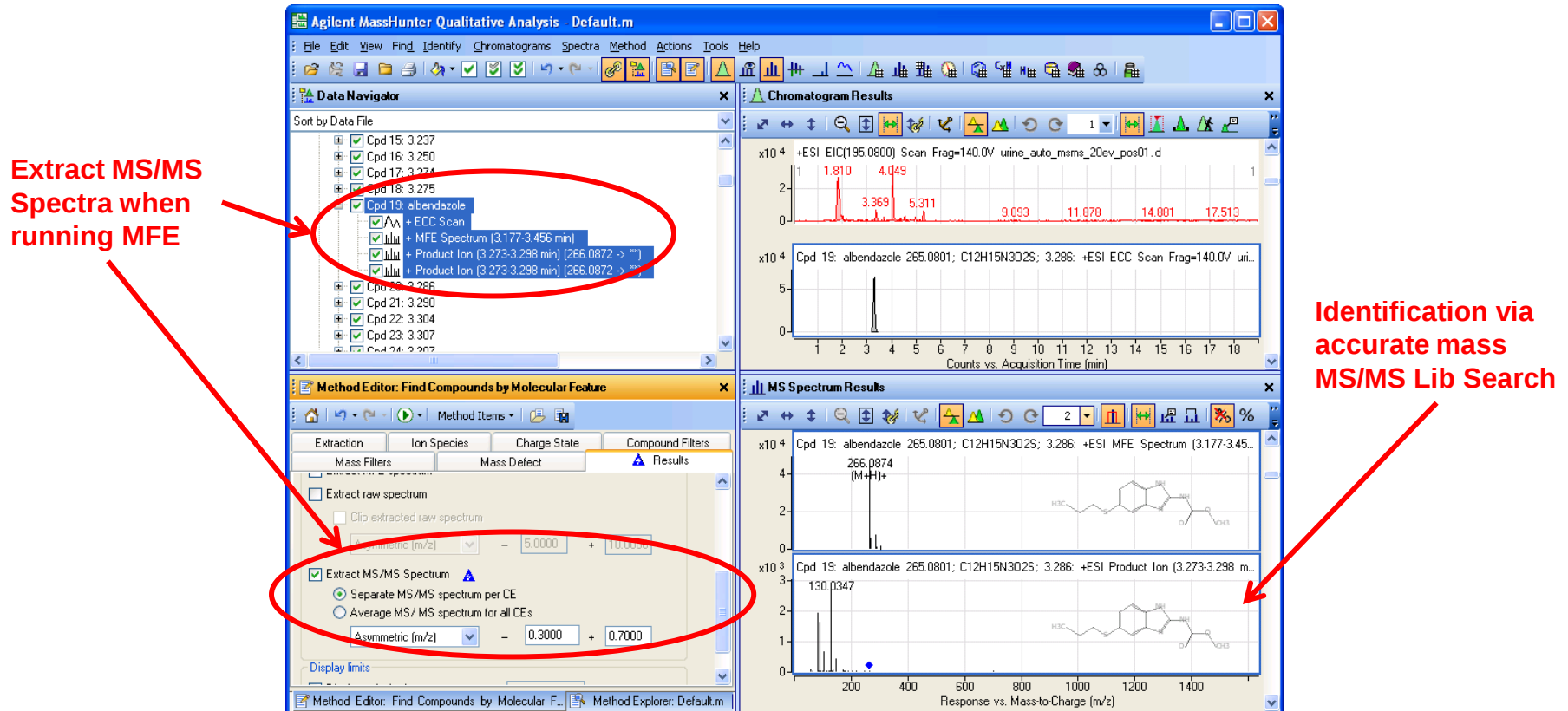
Unterstützt:

METLIN AMRT PCD B.04.00
METLIN AMRT PCDL B.04.00
For/Tox AM PCD B.04.00
For/Tox AM PCDL B.04.00
Pesticide AM PCD B.04.00

- **Personal Compound Database and Libraries (PCDLs)** für **akkurate Masse Datenbank und MS/MS Bibliothekssuche** mit optionaler Retentionszeit
- Einfügen von weiteren Komponenten MS und RT Information, sowie AM MS/MS Spektren bei verschiedenen Kollisionsenergien mit der neuen **PCDL Manager** Software
- Nutzung, Erstellung und Editieren von PCDs und PCDLs auf Ihrem PC für maximale Datensicherheit

Forensics/Tox Accurate Mass PCDL

“Broecker, Herre & Pragst” – MS/MS Spektren für 2600 Cmpds



- Die Forensics/Tox accurate mass PCD enthält 7500 Komponenten
- Die Forensics/Tox accurate mass PCDL enthält **7900 MS/MS Spektren von über 2600 Komponenten** bei 3 Kollisionsenergien vorwiegend in positive ion Mode.
- Die **ERSTE** kommerzielle **accurate mass MS/MS Spektren Bibliothek!**



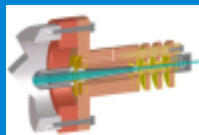
Agilents Lösungen für die MS - Überblick

Separations Technology



- 1290 Infinity UHPLC
- HPLC-Chip II
- 7100 CE
- 7890A GC

MS Detector Technology



- 7000A GC Triple Quad
- 7700 Series ICP-MS
- 6100 Single Quad Series
- 6200 TOF series
- 6400 Triple Quadrupole series
- 6500 QTOF series

Data Analysis / Application Software



- MassHunter Workstation Data Acq, Qual and Quant
- Mass Profiler Professional with Pathway Analysis
- Personal Compound Databases and Libraries (PCDLs)
 - PCDs for Pesticides, Forensics/Tox, and endogenous metabolites (AMRT)
 - PCDs for Forensics/Tox and endogenous metabolites (AMRT)
- Metabolite ID Software

Solutions



- Fast Track Solution Kits for LC, GC, LC/MS & GC/MS
 - Petrochemical
 - Food Safety
 - Environmental
 - Toxicology
- Metabolomics / Proteomics Standards & Workflows



Einsatzgebiete der LC/MS(MS)

Sehr niedrige Nachweigrenzen mit hoher Spezifität erreichen Triplequadrupol-LC/MS-Geräte. Sie kommen überall zum Einsatz, wo es um die quantitative Fragestellungen geht.

TOF und Q-TOF Geräte eignen sich für qualitative und quantitative Fragestellungen. Haupteinsatzgebiet ist allerdings meist die qualitative Analyse.

LC/MS-Geräte kommen immer dann zum Einsatz, wenn Empfindlichkeit, Spezifität und/oder Informationsgehalt klassischer HPLC-Detektoren nicht ausreichen.



Vielen Dank